

Extrahepatische Aktivierung
aromatischer Amine und ihrer Derivate
durch Hämoglobin

Heidrun Sterzl

Diss
München
1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554004_0006

Extrahepatische Aktivierung aromatischer Amine
und ihrer Derivate durch Hämoglobin

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Heidrun Sterzl
aus München

Dissertation, eingereicht am 12.6.1984

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Lenk
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.1984

Meine Eltern, ich bin froh, dass ich heute hier sein darf
für die Arbeit, die ich heute machen darf. Ich bin froh, dass
ich heute hier sein darf. Ich bin froh, dass ich heute hier sein darf.

Meine Eltern, ich bin froh, dass ich heute hier sein darf
für die Arbeit, die ich heute machen darf. Ich bin froh, dass
ich heute hier sein darf. Ich bin froh, dass ich heute hier sein darf.

Meine Eltern, ich bin froh, dass ich heute hier sein darf
für die Arbeit, die ich heute machen darf. Ich bin froh, dass
ich heute hier sein darf. Ich bin froh, dass ich heute hier sein darf.

Meine Eltern, ich bin froh, dass ich heute hier sein darf
für die Arbeit, die ich heute machen darf. Ich bin froh, dass
ich heute hier sein darf. Ich bin froh, dass ich heute hier sein darf.

Meine Eltern, ich bin froh, dass ich heute hier sein darf
für die Arbeit, die ich heute machen darf. Ich bin froh, dass
ich heute hier sein darf. Ich bin froh, dass ich heute hier sein darf.

Meine Eltern, ich bin froh, dass ich heute hier sein darf
für die Arbeit, die ich heute machen darf. Ich bin froh, dass
ich heute hier sein darf. Ich bin froh, dass ich heute hier sein darf.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. W. Lenk danke ich sehr herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, seine jederzeit gewährte Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen über Planung, Durchführung und Deutung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. G. Hartmann und Herrn Prof. Dr. W. Forth danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Eyer für die großzügige Unterstützung und viele wertvolle Ratschläge und Diskussionen.

Frau I. Buhrow und Herrn Prof. Dr. W. Schäfer vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Frau G. Schild und Herrn Priv.Do. Dr. J. Sonnenbichler vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Frau R. Heilmair danke ich für die hervorragende technische Assistenz.

ZUSAMMENFASSUNG	1
EINLEITUNG	8
MATERIAL	13
1. Chemikalien	13
2. Biochemika	15
3. Biologisches Material	16
METHODEN	17
1. Biologisches Material	17
1.1. Versuche mit Ratten	17
1.2. Erythrozyten-Suspensionen	17
1.3. Hämoglobin-Lösungen	18
1.4. Mikrosomen-Suspensionen	20
2. Probenaufarbeitung	21
2.1. Analyse von Vollblut, Erythrozyten-Suspensionen und Hämoglobin-Lösungen	21
2.2. Analyse von Mikrosomen-Suspensionen	23
3. Analyse der Etherextrakte	24
3.1. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	24
3.2. Dünnschichtchromatographie	24
4. Bestimmung einzelner Verbindungen	25

4.1. 4-Chloranilin und 3.4-Dichloranilin	25
4.2. Nitroso-4-chlorbenzol und N-Hydroxy-4-chloranilin	27
4.3. 4-Aminophenol	28
4.4. N-Arylacetohydroxamsäuren	29
5. Ferrihämoglobin-Bestimmung	29
5.1. Cyanid-Methode	29
5.2. Extinktionszunahme bei 630 nm	30
6. Bestimmung von Enzymaktivitäten	31
6.1. Acetylcholinesterase	31
6.2. Katalase	31
7. Proteinbestimmung	32
8. Bestimmung von Hämoglobin-SH-Gruppen	32
9. Geräte	33
ERGEBNISSE	34
1. In vivo-Versuche mit Ratten	34
1. 1. Ferrihämoglobin-Bildung durch aromatische Amine	34
1. 2. Ferrihämoglobin-Bildung durch Arylhydroxylamine	36
1. 3. Ferrihämoglobin-Bildung durch 2-Aminophenole	38
1. 4. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylacetamide	39
1. 5. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylacetohydroxamsäuren	41
1. 6. Einfluß von Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) auf Ferrihämoglobin- und Nitroso-4-chlorbenzol-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid ,	43
1. 6. 1. Ferrihämoglobin-Bildung	45
1. 6. 2. Nitroso-4-chlorbenzol-Konzentration	45

1. 7. Metabolite von N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid	46
1. 7. 1. N-Hydroxy-4-chloranilin	46
1. 7. 2. N-Hydroxy-4-chloracetanilid	47
1. 8. Metabolite von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren	49
2. In vitro-Versuche mit Erythrozyten	52
2. 1. Ferrihämoglobin-Bildung durch aromatische Amine	52
2. 2. Reaktionsprodukte aromatischer Amine	56
2. 2. 1. 4-Chloranilin	56
2. 2. 2. 3,4-Dichloranilin	57
2. 2. 3. 4-Phenetidin	58
2. 2. 4. Anilin	59
2. 3. Beziehung zwischen Ferrihämoglobin- und 4-Aminophenol-Bildung aus Anilin	62
2. 4. Ferrihämoglobin-Bildung durch Arylhydroxylamine	65
2. 5. Einfluß von Glucose und Lactat auf die Ferrihämoglobin- Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin	68
2. 5. 1. N-Hydroxy-4-chloranilin in Rindererythrozyten- Suspensionen	70
2. 5. 2. N-Hydroxy-4-chloranilin in Rattenerythozyten- Suspensionen	72
2. 6. Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-4-chloranilin	73
2. 7. Ferrihämoglobin-Bildung durch Aminophenole	73
2. 8. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylacetamide	77
2. 9. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylacetohydroxamsäuren	79
2.10. Einfluß von Glucose und Lactat auf die Ferrihämoglobin- Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid	81

2.10. 1. N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Rindererythrozyten-Suspensionen	81
2.10. 2. N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Rattenererythrozyten-Suspensionen	83
2.11. Reaktionsprodukte von N-Arylaceto hydroxamsäuren	83
2.11. 1. Verschiedene N-Arylaceto hydroxamsäuren in Rindererythrozyten-Suspensionen	83
2.11. 2. N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Rindererythrozyten-Suspensionen	84
2.11. 3. N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Rattenererythrozyten-Suspensionen	86
2.11. 4. N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren in Rindererythrozyten-Suspensionen	86
2.12. Einfluß von Paraoxon auf Ferrihämoglobin- und 4-Chloranilin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid	89
2.12. 1. Ferrihämoglobin-Bildung	90
2.12. 2. 4-Chloranilin-Bildung	92
2.13. Anaerobe Reaktion der N-Arylaceto hydroxamsäuren in Erythrozytensuspensionen	94
3. In-vitro-Versuche mit gereinigtem Human-Hämoglobin	95
3. 1. Ferrihämoglobin-Bildung durch Anilin und 4-Chloranilin	95
3. 2. Reaktionen von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Hämoglobin	97
3. 2. 1. Spektroskopische Befunde	97
3. 2. 2. Sauerstoff als dritter Reaktionspartner	98
3. 3. Kinetik der Hämoglobin-Oxidation durch N-Hydroxy-4-chloranilin	100

3. 4. Bestimmung der Aktivierungsenergie der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Hämoglobin	100
3. 5. Bestimmung der katalytischen Aktivität von N-Hydroxy-4-chloranilin	102
3. 6. Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-4-chloranilin	104
3. 7. Vergleich der Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy- 4-chloranilin und Nitroso-4-chlorbenzol	107
3. 8. Reaktionen von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Hämoglobin ...	108
3. 8. 1. Spektroskopische Befunde	108
3. 8. 2. Sauerstoff als dritter Reaktionspartner	108
3. 9. Kinetik der Hämoglobin-Oxidation durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid	109
3.10. Bestimmung der Aktivierungsenergie der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Hämoglobin	111
3.11. Bestimmung der katalytische Aktivität von N-Hydroxy-4-chloracetanilid	112
3.12. Einfluß des pH auf die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid	112
3.13. Einfluß von Katalase auf die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid	114
3.14. Einfluß von Superoxid-Dismutase auf die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid	116
3.15. Einfluß von NADH oder NADPH auf die Reaktionen von Nitroso-4-chlorbenzol und N-Hydroxy-4-chloracetanilid	117
3.16. Bedeutung der SH-Gruppen im Hämoglobin bei der Reaktion mit N-Hydroxy-4-chloracetanilid	119
3.16. 1. Bestimmung der freien Hämoglobin-SH-Gruppen nach Reaktion mit N-Hydroxy-4-chloracetanilid	120
3.16. 2. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Hämoglobin mit blockierten SH-Gruppen	121
3.17. Bindung von N-Hydroxy-4-chloracetanilid an Hämoglobin	121

3.18. Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-4-chloracetanilid	123
3.18. 1. mit Oxyhämoglobin	125
3.18. 2. mit Oxyhämoglobin mit blockierten SH-Gruppen	125
3.18. 3. mit Carboxyhämoglobin	126
3.18. 4. mit Ferrihämoglobin	127
3.18. 5. mit Globin	128
3.19. Kinetik der Ferrihämoglobin-Bildung durch verschiedene N-Arylacetoxyhydroxamsäuren	129
3.20. Bestimmung der katalytischen Aktivität von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren	131
3.21. Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren	131
4. In-vitro-Versuche mit Lebermikrosomen	134
4. 1. N- und Ring-Hydroxylierung von 4-Chloranilin und 3,4-Dichloranilin	134
4. 2. N-Dehydroxylierung von N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-3,4-dichloranilin	139
Anhang: N-Deacylierung von 4-Chlorpropionanilid und 3,4-Dichlorpropionanilid	142
1. Kinetik der Arylamin-Bildung	142
2. Abhängigkeit der Arylamin-Bildung von der Substratkonzentration	143
3. Arylamin-Bildung in Gegenwart von Paraoxon	144
DISKUSSION	147
LITERATURVERZEICHNIS	181
ABKÜRZUNGEN	200

ZUSAMMENFASSUNG

Versuche mit Hämoglobin im Erythrozyten in vivo

1. Die Oxidation des roten Blutfarbstoffs in vivo gilt in der Regel als ein Indikator für die metabolische Aktivierung von aromatischen Aminen und ihren Derivaten. Daher wurden die Ferrihämoglobin-bildenden Eigenschaften bestimmter Arylamine, ihrer N-Acetyl- und N-Hydroxy-Derivate, und der N-Hydroxy-N-arylacetamide in der Ratte untersucht. Die Kinetik der Ferrihämoglobin-Bildung sollte Auskunft darüber geben, welchen Einfluß verschiedene N-Aryl-Substituenten und die synthetische N-Hydroxylierung und/oder N-Acylierung auf die metabolische Aktivierung in vivo haben.
2. Bis vor kurzem galt, daß die mischfunktionellen Aminoxidasen und die verschiedenen Formen von Cytochrom P-450 vor allem in der Leber aromatische Amine und ihre Derivate metabolisch aktivieren. Der erste Hinweis, daß auch Oxyhämoglobin aromatische Amine aktivieren kann, stammt von Juchau & Symms (1972). Ferrihämoglobin-Bildung in vivo ist also nicht nur ein Indikator für metabolische Aktivierung durch hepatische Enzyme, sondern möglicherweise auch für die Aktivierung durch Oxyhämoglobin im Erythrozyten. Weil aber zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt war, ob und in welchem Ausmaß der Erythrozyt zur biochemischen Aktivierung aromatischer Amine und ihrer Derivate befähigt ist, wurde die Wirkung der Arylamine und ihrer Derivate in vivo verglichen mit ihrer biochemischen Aktivität in vitro im isolierten Erythrozyten und gegenüber gereinigtem Hämoglobin. Aufgrund der Ergebnisse der in-vivo-Versuche kann nicht entschieden werden, ob die im Erythrozyten beobachtete biochemische Aktivierung für die Toxizität aromatischer Amine und ihrer Derivate Bedeutung hat, da die Stoffwechselleistung der Leber nicht bekannt ist.

3. Anilin, 4-Phenetidin, 4-Chloranilin, 3,4-Dichloranilin, 4-Aminobiphenyl und 2-Aminofluoren, die entsprechenden N-Arylacetamide, Arylhydroxylamine, Aminophenole und N-Hydroxy-N-arylacetamide wurden Ratten injiziert oder in Suspensionen roter Zellen inkubiert. Sowohl in vivo als auch in vitro erwiesen sich die Arylhydroxylamine als die aktivsten Ferrihämoglobin-Bildner, gefolgt von den N-Arylacetohydroxamsäuren.
4. Unter den sechs in der Ratte getesteten Arylhydroxylaminen war N-Hydroxy-4-chloranilin am stärksten und N-Hydroxy-2-aminofluoren am schwächsten wirksam. Die N-Hydroxy-N-arylacetamide, die als mögliche Vorstufen für die kanzerogene Wirkung bestimmter N-Arylacetamide diskutiert werden, waren jeweils schwächer wirksam als die entsprechenden Arylhydroxylamine.
5. Unterschiede in der Löslichkeit der monocyclischen und der polycyclischen N-Arylacetohydroxamsäuren können erklären, warum nach Injektion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid rasche Invasion ins Blut und Ferrihämoglobin-Bildung beobachtet wurde, während nach Injektion von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren die Wirkung sehr viel langsamer einsetzte.
6. Bestimmung der Nitroso-4-chlorbenzol-Konzentration, dem Oxidationsprodukt von N-Hydroxy-4-chloranilin, und der damit verbundenen Ferrihämoglobin-Konzentration sowohl nach Injektion von N-Hydroxy-4-chloranilin als auch nach Injektion seines N-Acetyl-Derivats N-Hydroxy-4-chloracetanilid haben gezeigt, daß aus der N-Arylacetohydroxamsäure in vivo das Arylhydroxylamin gebildet wird und allein für die Ferrihämoglobin-bildende Wirkung verantwortlich sein kann.
7. Der Esterase - Inhibitor Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid in der Ratte. Auch die Nitroso-4-chlorbenzol-Konzentration wurde nicht beeinflusst, ein Hinweis, daß nicht allein die enzymatische N-Deacetylierung für

die Aktivierung von N-Arylaceto hydroxamsäuren eine Rolle spielt, sondern auch eine oxidative N-Deacylierung, die durch den Häm-aktivierten Sauerstoff bewirkt wird.

Versuche mit Hämoglobin im Erythrozyten in vitro

8. Um die biochemische Aktivierung von Arylaminen und ihren Derivaten durch die Enzyme der Leber auszuschließen, wurden Versuche mit gewaschenen Rinder- und Rattenerythrozyten in vitro ausgeführt. Auch in Erythrozytensuspensionen in vitro bildeten Arylhydroxylamine schneller Ferrihämoglobin als die entsprechenden N-Arylaceto hydroxamsäuren.
9. Um eine Beteiligung von N-Arylamidasen (Esterasen) des Erythrozyten an der Aktivierung von N-Arylaceto hydroxamsäuren auszuschließen, wurde die Acetylcholinesterase-Aktivität in den Erythrozyten durch Zusatz von Paraoxon gehemmt. Die Folge war, daß zwar die Bildung von 4-Chloranilin aus N-Hydroxy-4-chloranilin/Nitroso-4-chlorbenzol (den Folgeprodukten der N-Deacetylierung von N-Hydroxy-4-chloracetanilid), nicht aber die N-Hydroxy-4-chloracetanilid-induzierte Ferrihämoglobin-Bildung gehemmt wurde, ein Hinweis darauf, daß die Aktivität der Acetylcholinesterase im Erythrozyten keine Bedeutung für die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylaceto hydroxamsäuren hat.
10. Während die katalytische Aktivität der Hämoglobin-Oxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin durch Glucose in Rinder- und Rattenerythrozyten unterstützt wurde, war keine Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von N-Hydroxy-4-chloracetanilid von Glucose zu beobachten. Diese Ergebnisse haben bestätigt, daß Arylhydroxylamine durch enzymatische Reduktion im Erythrozyten regeneriert werden und so mehrmals mit Hämoglobin reagieren können, während die katalytische Aktivität von N-Arylaceto hydroxamsäuren anders erklärt werden muß.
11. Suche nach Metaboliten von N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Ery-

throzytensuspensionen zeigte, daß nur max. 3% der eingesetzten Verbindung in Form von Reaktionsprodukten gefunden wurden, die Hauptmenge der N-Arylaceto- α -hydroxamsäure wurde unverändert wiedergefunden. Da mit zunehmender Ferrihämoglobin-Konzentration auch die Konzentration von 4-Chloracetanilid, Nitroso-4-chlorbenzol und 4-Chloranilin zunahm, kann geschlossen werden, daß eine Beziehung zwischen der Hämoglobin-Oxidation und der Bildung von 4-Chloracetanilid und Nitroso-4-chlorbenzol besteht. 4-Chloranilin kann durch enzymatische Reduktion von Nitroso-4-chlorbenzol gebildet werden.

Versuche mit gereinigtem Hämoglobin in vitro

12. Um die Beteiligung von N-Arylamidasen (Esterasen) und Reduktasen des Erythrozyten auf die Arylhydroxylamin- und N-Arylaceto- α -hydroxamsäure-katalysierte Hämoglobin-Oxidation auszuschließen, wurden Versuche mit gereinigtem Human-Hämoglobin ausgeführt. Arylhydroxylamine und N-Arylaceto- α -hydroxamsäuren oxidierten auch gereinigtes Human-Hämoglobin mit verschiedener Geschwindigkeit, ein Hinweis auf Unterschiede im Mechanismus der beiden Oxidationen.
13. Beide Oxidationen folgten einem Zeitgesetz 2.Ordnung. Für die sehr schnelle Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Oxyhämoglobin wurde bei 37°C und pH 7.4 eine Geschwindigkeitskonstante von $7840 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ gefunden, dagegen für die viel langsamere Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Oxyhämoglobin $3.4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$.
14. Für die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Oxyhämoglobin wurde eine Aktivierungsenergie von $3.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ bestimmt, für die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Oxyhämoglobin dagegen von $12.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.
15. Während bei der schnellen Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Oxyhämoglobin ein Äquivalent Hämoglobin-Eisen(II) oxidiert

wurde, zeigte N-Hydroxy-4-chloracetanilid katalytische Aktivität, denn pro N-Arylaceto-hydroxamsäure wurden bis zu 45 Äquivalente Hämoglobin-Eisen(II) oxidiert.

16. Auf der Suche nach Metaboliten von N-Hydroxy-4-chloracetanilid, die Aufschluß über die molekularen Vorgänge während der Hämoglobin-Oxidation geben könnten, wurde eine ähnliche Beziehung zwischen der Ferrihämoglobin- und der Nitroso-4-chlorbenzol- und 4-Chloracetanilid-Konzentration wie in Erythrozyten gefunden. Das zeigt, daß N-Hydroxy-4-chloracetanilid während der Hämoglobin-Oxidation oxidiert worden ist, denn Nitroso-4-chlorbenzol und 4-Chloracetanilid entstehen auch bei der Oxidation von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit chemischen Oxidationsmitteln.
17. Die hohe katalytische Aktivität der N-Arylaceto-hydroxamsäuren und das geringe Ausmaß ihrer Metabolisierung legen den Schluß nahe, daß nicht die N-Arylaceto-hydroxamsäuren selbst, sondern die durch Einelektronenoxidation entstehenden sekundären aromatischen Nitroxidradikale die Träger der katalytischen Aktivität sind. So könnte z.B. Acetyl-4-chlorphenylnitroxid, das durch Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit dem aktivierten Sauerstoff des Oxyhämoglobins gebildet wird, mit Desoxy-Ferrohämoglobin unter Bildung von Ferrihämoglobin und Rückbildung der N-Arylaceto-hydroxamsäure reagieren. Durch Selbstreaktion des Nitroxidradikals könnte die Bildung von Nitroso-4-chlorbenzol, Nitro-4-chlorbenzol und 4-Chloracetanilid erklärt werden.
18. Bei der Autoxidation von Oxyhämoglobin entstehen reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. Superoxid, Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff und möglicherweise auch Hydroxyl-Radikale, die für die Bildung des sekundären aromatischen Nitroxidradikals verantwortlich sein können. Weder Superoxid-Dismutase noch Katalase hatten jedoch Einfluß auf die Geschwindigkeit der N-Hydroxy-4-chloracetanilid - induzierten Ferrihämoglobin-Bildung. Daraus kann geschlossen werden, daß weder Superoxid noch Per-

oxid bei der Co-Oxidation eine Rolle spielen. Möglicherweise vollzieht sich die gekoppelte Oxidation von N-Hydroxy-4-chlor-acetanilid und Ferrohämoglobin in situ durch den am Ferrohäm gebundenen Sauerstoff bis zu seiner vollständigen Reduktion zu Wasser.

19. Die untersuchten Reaktionen von Oxyhämoglobin mit Arylhydroxylaminen und N-Arylaceto-hydroxamsäuren sind ein Hinweis, daß Oxyhämoglobin Peroxidase-Aktivität hat. Die Elektronen der Ferrohäme werden auf Sauerstoff übertragen, wobei die N-Arylaceto-hydroxamsäuren als Katalysator dieser Elektronenübertragung wirken, indem sie zunächst ein Elektron auf den Häm-aktivierten Sauerstoff übertragen. Aus der radikalischen Zwischenstufe werden die N-Arylaceto-hydroxamsäuren durch Reaktion mit Desoxy-Ferrohämoglobin immer wieder regeneriert.
20. Entgegen der bisher gültigen Ansicht oxidierten aromatische Amine Hämoglobin auch in vitro in Erythrozytensuspensionen vom Rind und in Lösungen von gereinigtem Human-Hämoglobin. Die sigmoide Kinetik der Ferrihämoglobin-Bildung ist Indikation für eine autokatalytische Reaktion.
21. Die Ferrihämoglobin-Bildung durch aromatische Amine in Erythrozyten war gekoppelt mit der Bildung N- und (oder) C-oxygenierter Produkte von unterschiedlicher Ferrihämoglobin-bildender Aktivität. Wenn N- und (oder) Ring-hydroxylierte Produkte hoher Aktivität gebildet wurden, wurde nach einer lag-Phase ein rascher Anstieg der Ferrihämoglobin-Konzentrationen beobachtet. Dagegen stieg die Ferrihämoglobin-Konzentration nur langsam an, wenn Produkte mit geringer Ferrihämoglobin-bildender Aktivität gebildet wurden. Aus Versuchen mit synthetischen N- und Ring-Hydroxy-Derivaten aromatischer Amine und Rindererythrozyten wurde ermittelt, daß die jeweils gefundenen Konzentrationen der N- und (oder) C-Oxygenierungsprodukte die gemessenen Ferrihämoglobin-Konzentrationen weitgehend erklären können.

22. Die gleichen Produkte wie bei der Reaktion von 4-Chloranilin und 3.4-Dichloranilin mit Oxyhämoglobin in Erythrozyten wurden auch durch die mischfunktionellen Oxygenasen von Lebermikrosomen gebildet. Die N-Hydroxylierung durch Mikrosomen war jedoch 1000 - 5000mal, die Ring-Hydroxylierung 25 - 250mal schneller als durch Oxyhämoglobin in Erythrozyten.
23. Diese Ergebnisse haben gezeigt, daß Oxyhämoglobin auch Peroxygenase-Aktivität hat, da der bei der Autoxidation von Oxyhämoglobin freigesetzte aktive Sauerstoff auf aromatische Amine übertragen wird und sowohl den Stickstoff als auch aromatische C-Atome oxygenieren kann. Diese Reaktion verläuft analog zur Oxygenierung körperfremder Stoffe durch hepatisches Cytochrom P-450.

EINLEITUNG

Zahlreiche Arzneimittel und Zwischenprodukte bei der Synthese von Farbstoffen oder Herbiziden enthalten freie oder substituierte Aminogruppen. Die toxischen Wirkungen aromatischer Amine und ihrer N-Acyl-Derivate werden erst durch biochemische Aktivierung zu N- und Ring-hydroxylierten Metaboliten beobachtet und variieren je nach Art des aromatischen Restes. Polycyclische aromatische Amine wie z.B. 2-Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl oder 2-Aminofluoren sind als wirksame Kanzerogene bekannt, während toxische Wirkungen der monocyclischen Verbindungen auf das Hämoglobin im Erythrozyten besonders ausgeprägt zu beobachten sind. Schon geringe Konzentrationen von N- oder Ring-hydroxylierten Derivaten aromatischer Amine im Blut können einen großen Teil des Hämoglobins oxidieren (Übersicht bei Kiese, 1974) oder Heinz-Körper-Bildung und hämolytische Anämie bewirken (Beutler, 1969).

Die Oxidation des Hämoglobins ist daher ein empfindlicher Indikator für die Entstehung reaktiver Metabolite aus Arylaminen, obwohl Wieland & Neumann (1978) zeigten, daß die Ferrihämoglobin-Bildung nicht immer das Ausmaß der N-Hydroxylierung eines aromatischen Amins in vivo widerspiegelt. Ein Zusammenhang zwischen der Ferrihämoglobin-Bildung und der Organtoxizität bzw. der kanzerogenen Wirkung einer Verbindung wurde mehrfach diskutiert, aber nicht bewiesen (z.B. Beziehung zwischen Hämato- und Nephrotoxizität von Phenacetin bei Raaflaub & Dubach, 1969; Dubach & Raaflaub, 1969, oder Ferrihämoglobin-Bildung und kanzerogener Wirkung bei Neish, 1959; Radomski & Brill, 1970; 1971).

Während zunächst die ortho-Hydroxylierung für die kanzerogene Wirkung aromatischer Amine verantwortlich gemacht wurde (2-Naphthylamin, Clayson, 1953), konnte Kiese (1959a) die N-Hydroxylierung von Anilin in vivo nachweisen und das N-Hydroxy-Derivat allein für die Ferrihämoglobin-Bildung verantwortlich machen, die nach Injek-

tion von Anilin beobachtet wird (Kiese, 1959b). Cramer et al. (1960) zeigten, daß 2-Acetylaminofluoren in vivo N-hydroxyliert wird und daß das N-Hydroxy-N-arylacetamid stärker kanzerogen wirkt als das entsprechende N-Arylacetamid und auch am Ort der Applikation Tumoren erzeugt (Übersicht bei Radomski, 1979; Weisburger, 1978).

Als Ort der N- und C-Oxygenierung aromatischer Amine und Amide galt bisher vor allem die Leber. Zwei Enzyme, die mischfunktionelle Oxygenase Cytochrom P-450 und eine mischfunktionelle Aminoxidase in den glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulums sind verantwortlich für die Oxygenierung körperfremder Stoffe, die eine Entgiftung, aber auch eine Giftung bedeuten kann, wenn biologisch aktive Hydroxyderivate gebildet werden (Übersicht bei Estabrook & Werringloer, 1977; White & Coon, 1980; Hlavica, 1982).

Hämoglobin ist wie Cytochrom P-450 ein Hämoprotein mit einem Eisen-Protoporphyrin-Ring als prosthetische Gruppe. Während Cytochrom P-450 molekularen Sauerstoff aktiviert und auf endogene oder exogene Substrate überträgt, besteht die physiologische Funktion des Hämoglobins in der reversiblen Bindung und dem Transport des Sauerstoffs zu den Geweben. Da es aber sowohl NADH- als auch NADPH-abhängige Reduktasen im Erythrozyten gibt, die Ferrihämoglobin, oxidiertes Glutathion und auch körperfremde Stoffe reduzieren können, läßt sich eine Ähnlichkeit mit dem Cytochrom P-450-System erkennen.

Erste Hinweise auf eine Peroxygenase-Aktivität von Oxyhämoglobin erhielten Juchau & Symms (1972). Mieyal et al. (1976) konnten in einem rekonstituierten System, bestehend aus Hämoglobin, NADPH und Cytochrom P-450-Reduktase in Gegenwart von Sauerstoff die Bildung von 4-Aminophenol aus Anilin nachweisen. Tomoda et al. (1976) und Blisard & Mieyal (1976) fanden diese Reaktion, eine Analogie zur para-Hydroxylierung von Anilin durch mikrosomales Cytochrom P-450, auch in Erythrozyten und Vollblut.

Aber auch Peroxidase-Aktivität von Oxyhämoglobin wurde beobachtet, d.h. Oxyhämoglobin kann Elektronendonatoren wie z.B. Phenylhydro-

xylamin (Kiese, 1974), 4-Dimethylaminophenol (Eyer et al., 1974) oder Adrenalin (Misra & Fridovich, 1972) oxidieren, wobei die Disauerstoffspezies reduziert wird. Die Produkte der gekoppelten Oxidation sind Ferrihämoglobin und Nitrosobenzol, 4-Dimethylaminophenoxyradikal bzw. Adrenochrom.

Weiss (1964), Peisach et al. (1968) und Yamamoto et al. (1973) haben aufgrund der physikalischen Eigenschaften von Oxyhämoglobin den Bindungszustand des Sauerstoffs an das Häm-Eisen(II) mit den beiden Grenzstrukturen (I) und (II) beschrieben, in denen Superoxid (O_2^{*-}) als "leaving group" vorgebildet ist:



Tatsächlich läßt sich der Bindungszustand des Sauerstoffs im Oxyhämoglobin besser als Polarisation der Elektronendichteverteilung zwischen Eisen und Sauerstoff denn als getrenntes Häm-Eisen(III) und Superoxid beschreiben (Wallace et al., 1974). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß bei der Autoxidation von Hämoglobin auch tatsächlich Superoxid entsteht (Misra & Fridovich, 1972; Wever et al., 1973; Wallace et al., 1974; Gotoh & Shikama, 1976; Goldberg & Stern, 1977). In Gegenwart von externen Elektromendonatoren entstand Peroxid (Wallace & Caughey, 1975; Kawanishi & Caughey, 1979). Auch die Bildung von Singulett-Sauerstoff aus Superoxid wurde beobachtet (Possani et al., 1970; Khan, 1970). Diese reaktiven Sauerstoff-Spezies können in verschiedener Weise weiterreagieren. Superoxid dismutiert unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff (Czapski & Bielski, 1963). Wasserstoffperoxid reagiert mit Elektromendonatoren wie z.B. Superoxid (Harber & Weiss, 1934) oder nach einem Fenton-Mechanismus in Gegenwart von Eisen(II) unter Bildung von Hydroxyl-Radikalen (Walling, 1975).

Daher kann angenommen werden, daß die bei der Autoxidation von Oxyhämoglobin entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies organische Moleküle mit Elektromendonator-Eigenschaften oxidieren können, bzw.

daß der Häm-aktivierte Sauerstoff in der Art einer Monooxygenase-Reaktion auf organische Substrate übertragen werden kann.

Um die Bedeutung der Peroxidase- bzw. Peroxygenase-Aktivität von Oxyhämoglobin für die Biotransformation körperfremder Stoffe zu erkennen, wurde die Wirkung einiger ausgewählter Arylamine, N-Acylarylamine und ihrer N-Hydroxy- und Ring-Hydroxy-Derivate auf die Oxidation von Hämoglobin in vivo und in vitro untersucht. Dabei interessierte vor allem, welche biochemischen Reaktionen ablaufen und ob biologisch aktive Metabolite auch ohne Beteiligung hepatischer oder erythrozytärer Enzyme gebildet werden.

Die Ferrihämoglobin-Bildung in vivo und in vitro sowohl im intakten Erythrozyten als auch in Lösungen von isoliertem Hämoglobin ist ein guter Indikator für die Bildung von aktiven Metaboliten.

Von besonderem Interesse war die Peroxidase-Wirkung von Oxyhämoglobin auf N-Hydroxy-N-arylacetamide (N-Arylacetohydroxamsäuren), die sowohl von Heubner et al. (1953), als auch von Kiese & Plattig (1959) und Hustedt & Kiese (1959) untersucht wurden.

Ferrihämoglobin-Bildung durch N-acylierte Derivate aromatischer Amine erfolgt entsprechend früherer Auffassung erst nach enzymatischer Freisetzung der Arylamine und anschließender N- und/oder Ring-Hydroxylierung (Hjelm et al., 1972; Heymann et al., 1969; Singleton & Murphy, 1973). Da N-Arylacetamide andererseits sowohl in vivo als auch in vitro N-hydroxyliert und die N-Hydroxy-N-arylacetamide als Vorstufen für die Bildung des "ultimate carcinogens" diskutiert werden (Übersicht bei Miller & Miller, 1967), interessierte, ob auch diese Verbindungen Hämoglobin oxidieren.

Eigene orientierende Versuche (Sterzl, 1978) hatten gezeigt, daß die N-Arylacetohydroxamsäure - induzierte Ferrihämoglobin-Bildung durch Esteraseinhibitoren in Erythrozyten in vitro nicht beeinflusst wurde. Während Hustedt & Kiese (1959) und Kiese & Plattig (1959) aus ihren Versuchen mit N-Acetyl- bzw. N-Benzoylphenylhydroxylamin

in vivo und in vitro schlossen, daß N-Arylacetoxyhydroxamsäuren erst nach enzymatischer Hydrolyse Hämoglobin oxidieren, vermuteten Heubner et al. (1953) für die Reaktion von N-Arylacetoxyhydroxamsäuren mit Hämoglobin eine radikalische Zwischenstufe. Forrester et al. (1970) postulierten für die Oxidation von N-Arylacetoxyhydroxamsäuren mit chemischen Eielektronen - Oxidantien, wie z.B. Silberoxid, das sekundäre Nitroxid-Radikal als reaktive Zwischenstufe. Ein solches sekundäres aromatisches Nitroxid-Radikal wurde von Bartsch et al. (1971) durch Oxidation von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren mit Ferricyanid oder Meerettich - Peroxidase und Wasserstoffperoxid, nicht aber durch mischfunktionelle Oxidasen aus Rattenleber (Bartsch & Hecker, 1971) erzeugt.

Um den Mechanismus der N-Arylacetoxyhydroxamsäure-katalysierten Hämoglobin-Oxidation aufzuklären und ihn von der durch Arylhydroxylamine katalysierten Hämoglobin-Oxidation zu unterscheiden, wurden die Reaktionen einiger N-Arylacetoxyhydroxamsäuren und der entsprechenden Arylhydroxylamine in vivo und in vitro miteinander verglichen. Eine solche Untersuchung sollte zeigen, ob eine Aktivierung der N-Arylacetoxyhydroxamsäuren als Ausdruck einer esteratischen oder peroxidatischen Aktivität von Oxyhämoglobin erfolgt. Als Modellsubstanzen wurden dafür das besonders reaktive Arylhydroxylamin N-Hydroxy-4-chloranilin und die korrespondierende Hydroxamsäure N-Hydroxy-4-chloracetanilid ausgewählt.

MATERIAL

1. Chemikalien

Arylamine: AN, 4ClA, 3.4DClA, 4EA, 4ABi und 2AF waren Produkte der Firmen MERCK-SCHUCHARDT (München) und FLUKA (Neu-Ulm) und wurden vor Verwendung durch Sublimation oder Vakuumdestillation gereinigt.

N-Arylacetamide: 4ClAA, 3.4DClAA, 4AABi und 2AAF wurden aus den gereinigten Arylaminen durch Acetylieren mit Acetanhydrid in Ether hergestellt.

Folgende Schmelzpunkte wurden bestimmt: für 4ClAA nach Umkristallisation aus 50% Ethanol 181°C (Ingold et al., 1927, 175°C), für 3.4DClAA 122-123°C (Beilstein & Kurbatow, 1879, 120.5°C), für 4AABi 168-171°C (Hübner & Osten, 1881, 167°C) und für 2AAF 190-191°C (Diels et al., 1902, 191°C).

AA war ein Produkt der Firma MERCK-SCHUCHARDT (München), Phenacetin DAB 6 stammte von den Farbenfabriken BAYER (Leverkusen).

Arylhydroxylamine: NOH-AN wurde aus NO₂B durch Reduktion mit Zinkstaub und Ammoniumchlorid nach Bamberger (1890) synthetisiert: F.P. 83-84°C aus Benzol/n-Heptan (Bamberger, 1890, 81°C); NOH-4ClA aus NO₂-4ClB durch Reduktion mit Natriumhydrogensulfid nach Haworth & Lapworth (1921): Z.P. 86-87°C (Haworth & Lapworth, 1921, 86.5°C); NOH-3.4DClA aus NO₂-3.4DClB durch katalytische Reduktion mit Hydrazin und Palladium/Aktivkohle: Z.P. 114-117°C (Sterzl, 1978); NOH-4EA aus NO₂-4EB durch Reduktion mit Zinkstaub und Ammoniumchlorid nach Rising (1904); nach Waschen mit Benzol: Z.P. 90°C (Rising, 1904, 91°C); NOH-4ABi aus NO₂-4Bi durch Reduktion mit Zinkstaub und Ammoniumchlorid in Ethanol/Ethylenglykol-monomethylether nach Lees & Burawoy (1965): Z.P. 148°C (Bell et al., 1926, 152-154°C); NOH-2AF aus NO₂-2F durch Reduktion mit Schwefelwasserstoff und Ammoniak in Dimethylformamid/Ethanol nach Lotlikar et al. (1965): Zersetzung ab

130°C (Lenk, unveröffentlicht).

Aminophenole: 2- und 4-AP wurden von MERCK-SCHUCHARDT (München) bezogen. 2-OH-4ClA wurde nach Uhlemann (1869) aus 3-Chlorphenol durch Nitrierung, anschließende Reduktion mit Natriumdithionit in Gegenwart von Acetanhydrid/Eisessig und Verseifung der N-Acetylgruppe mit HCl gewonnen. 2-OH-3.4DClA und 6-OH-3.4DClA wurden aus NOH-3.4DClA durch Umlagerung mit 2.5 M H₂SO₄ und Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 98:2) gewonnen (Sterzl, 1978).

N-Arylacetohydroxamsäuren: NOH-4ClAA, NOH-4AABi und NOH-2AAF wurden aus den entsprechenden Nitroarenen durch katalytische Hydrierung in Gegenwart von Acetanhydrid und Triethylamin nach Poirier et al. (1963) hergestellt.

Folgende Schmelzpunkte wurden bestimmt: für NOH-4ClAA 111-112°C (Kiese & Lenk, 1971), für NOH-4AABi 145-146°C (Fries et al., 1973) und für NOH-2AAF 150-151°C (Fries et al., 1973).

NOH-4EAA wurde aus NO-4EB und Acetaldehyd nach Neunhoffer & Ruske (1961) synthetisiert und aus Ether umkristallisiert: F.P. 104°C (Fischbach, 1975). NOH-3.4DClAA wurde aus NOH-3.4DClA mit Thioessigsäure hergestellt: F.P. 126-127°C (Sterzl, 1978). NOH-AA wurde durch Acetylieren von NOH-AN mit Acetanhydrid nach Bamberger (1918) gewonnen und aus Benzol umkristallisiert: F.P. 64-65°C (Bamberger, 1918, 67-67.5°C aus Ligroin).

[U-¹⁴C]-NOH-4ClAA wurde aus [U-¹⁴C]-NOH-4ClA durch Einwirken von Acetanhydrid in Ether/Eisessig gewonnen. [U-¹⁴C]-NOH-4ClA war von Prof.Dr. P. Eyer durch Oxidation von radioaktiv markiertem 4ClA mit Kaliumpersulfat und anschließender Reduktion des NO-4ClB mit Glutathion hergestellt worden (Eyer & Schneller, 1983). Die spezifische Aktivität des so gewonnenen NOH-4ClAA betrug 1700 dpm/nmol.

Nitrosoarene: NOB war ein Produkt der Firma MERCK-SCHUCHARDT (München). NO-4ClB, NO-3.4DClB, NO-4EB und NO-4Bi wurden aus den entsprechenden Arylhydroxylaminen durch Oxidation mit Eisen(III)-chlorid dargestellt. Die Reinigung der Nitrosoarene erfolgte durch

Wasserdampfdestillation und anschließende Umkristallisation aus n-Heptan. Die Reinheit des so gewonnenen NO-4ClB wurde mit Hilfe der HPLC geprüft: es enthielt 0.7% NO₂-4ClB.

Nitroarene: NO₂B, NO₂-4ClB, NO₂-3.4DClB, NO₂-4EB, NO₂-4Bi und NO₂-2F waren Produkte der Firmen MERCK-SCHUCHARDT (München) und FLUKA (Neu-Ulm).

Bisazoxyarene: BAClB wurde durch Kondensation von NOH-4ClA und NO-4ClB mit Kaliumhydroxid gewonnen (Gattermann & Wieland, 1962, S. 161): F.P. nach Umkristallisation aus Ethanol 154-155°C (Heumann, 1872, 155-156°C).

Chromatographie: Für die Dünnschicht-Chromatographie zur Auftrennung von Metaboliten-Gemischen wurden DC-Fertigplatten (MERCK, Darmstadt), beschichtet mit 0.25 mm Kieselgel 60 F₂₅₄ oder Cellulose F verwendet. Für die säulenchromatographische Reinigung von löslichem HbO₂, HbFe³⁺ oder HbCO wurden Sephadex^R G 100, G 75 und G 25 (DEUTSCHE PHARMACIA, Freiburg) und DE 52-Cellulose (Whatman, Wiesbaden) verwendet.

Lösungsmittel (p.A.-Qualität) wurden von MERCK (Darmstadt) bezogen. Diethylether DAB 7 wurde vor Gebrauch destilliert.

Alle anderen Chemikalien (p.A.-Qualität) waren Produkte der Firma MERCK (Darmstadt).

2. Biochemika

Superoxid-Dismutase (EC 1.15.1.1), Glutathion, p-Chlormercuribenzoessäure und 3-Methylcholanthren wurde von SIGMA (München) bezogen. Katalase (EC 1.11.1.6), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49), Glucose-6-phosphat, NADH, NADPH, NADP⁺, 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoessäure) (=Ellman's Reagens) und S-Acetylthiocholin-

jodid waren Produkte der Firma BOEHRINGER (Mannheim). Paraoxon war ein Produkt der Farbenfabriken BAYER (Leverkusen), Tri-o-tolylphosphat stammte von EASTMAN KODAK COMPANY (Rochester, NY) und Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) von EGA Chemie (Steinheim). Phenobarbital-Na (5-Ethyl-5-phenylbarbitursäure-natriumsalz) wurde von MERCK (Darmstadt) bezogen.

3. Biologisches Material

Tiere: Weibliche Sprague-Dawley-Ratten (in Gruppen zu 10-25 Tieren) mit einem Gewicht von 200-300 g und männliche Chinchilla-Kaninchen (in Gruppen zu 2-5 Tieren) mit einem Gewicht von 2-2.5 kg wurden in ACME Stoffwechselkäfigen aus rostfreiem Stahl bei Standardlabordiät der Firma ALTROMIN (Lage/Lippe) und Wasser ad libitum gehalten.

Induktion mit Phenobarbital: Die Tiere erhielten 7 Tage lang täglich eine Dosis von 50 mg PB pro kg KG. Eine 2%ige Lösung von PB-Na in physiologischer Kochsalzlösung wurde mit 1 M HCl auf pH 7.4 eingestellt und die Suspension Ratten i.p. und Kaninchen s.c. injiziert.

Induktion mit 3-Methylcholanthren: Die Tiere erhielten an den Tagen 1, 4, 8 und 11 jeweils Dosen von 10 mg 3MCh pro kg KG in Olivenöl i.p. injiziert. Jeweils 24 h nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und ihre Lebern präpariert.

Rinderblut wurde vom Schlachthof München, Human-Erythrozyten-Konzentrat (nach Ablauf der Lagerfähigkeit) vom BRK München erhalten.

METHODEN

I. Biologisches Material

1. In-vivo-Versuche mit Ratten

Feste Substanzen, fein zerrieben, und Flüssigkeiten wurden mit einem Ultraturrax in 0.25%iger Agar-Lösung (aus 0.9%iger Kochsalzlösung) suspendiert. Leicht zersetzliche Substanzen (z.B. Arylhydroxylamine) wurden vor dem Suspendieren anhand des UV-Spektrums auf ihre Qualität geprüft, schnell suspendiert und sofort injiziert.

Weibliche Sprague-Dawley-Ratten von 200 - 250 g Gewicht erhielten i.p.-Injektionen von 1-4%igen Agarsuspensionen. Zur Ferrihämoglobin-Bestimmung wurden ca. 4 Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen, zur Bestimmung der Konzentration von Ausgangsmaterial und Umsetzungsprodukten im Blut wurden die Tiere dekapitiert und das aufgefangene Blut mit 2 ml 7%iger Titriplex-II-Lösung (=Äthylendinitrilotetraessigsäure) ungerinnbar gemacht.

Der Esterasehemmer BNPP wurde jeweils 30 min vor Injektion von NOH-4ClAA i.p. injiziert.

2. Erythrozyten-Suspensionen

1.5 l frisches Rinderblut wurde mit 20 ml einer Lösung von 20 g Natriumcitrat und 2 g Glucose zur Gerinnungshemmung gemischt. 5-10 ml Rattenblut, der Aorta abdominalis entnommen, wurden mit 2 ml 7%iger Titriplex-II-Lösung versetzt.

Die Erythrozyten wurden durch Zentrifugation (10 min bei 3000 g)

vom Plasma getrennt, dreimal mit 0.9%iger Kochsalz-Lösung (ohne Zusatz, mit 11 mM Glucose oder 18 mM Lactat) gewaschen und in gleichem Volumen Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung pH 7.4 ohne Zusatz, mit Glucose oder mit Lactat) suspendiert. Diese Suspensionen enthielten 8-19 g% Hämoglobin (entsprechend 5-12 mM Hämoglobin-Eisen).

Für Versuche mit Erythrozyten ohne Zusatz von Glucose oder Lactat wurden die mit Kochsalzlösung gewaschenen und in Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung suspendierten Erythrozyten 18 Stunden bei 37°C vorinkubiert, um eine Verarmung an endogenen Substraten, wie z.B. Glucose, zu bewirken (Uehleke, 1973).

Die Testsubstanz wurde entweder fein zerrieben oder in Methanol bzw. Aceton gelöst zugegeben (max. 1 Vol.% organisches Lösungsmittel).

Sollte die Kinetik der Ferrihämoglobin- oder Arylamin-Bildung durch Arylhydroxamsäuren in Gegenwart eines Esterasehemmers untersucht werden, so wurde 30 min mit der entsprechenden Menge Paraoxon oder TOTP vorinkubiert.

3. Hämoglobin-Lösungen

Gereinigtes Human-Hämoglobin wurde nach Eyer et al. (1975) aus Human-Erythrozyten-Konzentrat hergestellt. Ca. 100 ml des Erythrozytenkonzentrats wurden abzentrifugiert, in gleichem Volumen 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 suspendiert und fünfmal mit Pufferlösung gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellkonzentrat mit dem 2-3fachen Volumen Wasser und einer Spatelspitze Saponin gut verrührt. Zur vollständigen Hämolyse wurde mit Ultraschall fünfmal je 30 sec beschallt. Nach Zentrifugation (20 min bei 18800 g) wurden 70 ml des Hämolysats (10 g Hb/100 ml) an Sephadex^R G 100 fine (7 x 80 cm) mit 0.01 M Tris-HCl-Puffer pH 8.3 aufsteigend chromatographiert. Etwa 1000 ml der Hämoglobin-haltigen Fraktionen wurden

dann zum Ionenaustausch an DE 52-Cellulose (4 x 15 cm) chromatographiert und mit einem linearen Chlorid-Gradienten (jeweils 750 ml 0.01 M Tris-HCl pH 8.3 und 0.1 M Tris-HCl pH 7.0) eluiert. Die Hämoglobin-haltigen Hauptfraktionen wurden zum Konzentrieren erneut an DE 52-Cellulose (3 x 8 cm) gebunden. Nach mehrstündigem Stehen wurde das Hämoglobin mit 0.5 M NaCl in 0.1 M Tris-HCl pH 7.0 desorbiert. Die Ausbeute betrug ca. 30-35 ml gereinigtes Hämoglobin in 10-14%iger Lösung, max. Ferrihämoglobin-Gehalt 1-3%. Unmittelbar vor Verwendung wurde die Präparation 12 h gegen 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 dialysiert und die gewünschte Hämoglobin-Konzentration eingestellt. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Ferrihämoglobin wurde aus gereinigtem Human-Hämoglobin durch Oxidation mit der doppelt stöchiometrischen Menge Kaliumferriyanid (bezogen auf Hämoglobin-Eisen) hergestellt. Die Ferrihämoglobin-Lösung wurde zur Reinigung an Sephadex^R G 25 chromatographiert und mit 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 eluiert.

Carbonylhämoglobin: Eine Lösung von gereinigtem Human-Hämoglobin wurde 60 min unter leichtem Schwenken mit Kohlenmonoxid bei Zimmertemperatur begast. Nach Zugabe von wenig Natriumdithionit zur Reduktion von evtl. vorhandenem Ferrihämoglobin wurde die Reaktionsmischung unter CO an Sephadex^R G 25 chromatographiert und mit CO-begastem 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 eluiert. Vor Zugabe des Substrats zur Carbonylhämoglobin-Lösung wurde noch einmal mit CO begast und die Inkubation anschließend bei 37°C unter Überleiten von CO durchgeführt.

Desoxyhämoglobin: Für Versuche in Sauerstoff-freiem Medium wurde eine Lösung von gereinigtem Human-Oxyhämoglobin in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 in Thunberg-Küvetten 10 min mit Stickstoff begast. Die vollständige Überführung von Oxy- in Desoxyhämoglobin wurde anhand des Absorptionsspektrums zwischen 650 und 450 nm geprüft.

Globin: Häm- und Proteinkomponente des Hämoglobins wurden nach Teale (1959) durch Säure-Methylethylketon-Behandlung getrennt. Eine

Lösung von gereinigtem Human-Hämoglobin in Puffer wurde 12 h gegen Wasser dialysiert, um Salze möglichst vollständig zu entfernen. Die salzfreie Hämoglobin-Lösung wurde im Eisbad mit 1 M HCl auf pH 1.9 eingestellt und anschließend zweimal mit gleichem Volumen eiskalten Methylethylketons ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde verworfen, die Globinlösung gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

Hämoglobin mit blockierten SH-Gruppen: Eine Lösung gereinigten Human-Hämoglobins in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 wurde mit der doppelt stöchiometrischen Menge p-Chlormercuribenzoat (bezogen auf Hämoglobin-SH-Gruppen) 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 12 h bei 4°C gegen 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 dialysiert und die gewünschte Hämoglobin-Konzentration eingestellt. Bei zweifachem pCMB-Überschuß wurde eine 100%ige Blockade der Hämoglobin-SH-Gruppen gemessen.

4. Mikrosomen-Suspensionen

Lebern von 10-25 Ratten oder 2-5 Kaninchen wurden von anhängendem Bindegewebe befreit, zerkleinert, homogenisiert und 30 min mit dem doppelten Volumen 0.15 M KCl-Lösung gerührt. Die Suspension wurde 30 min bei 9900 g in einer MSE-Zentrifuge (HAAKE, Karlsruhe) und der Überstand anschließend bei 100000 g in einer Ultrazentrifuge (BECKMAN Spinco, München) zentrifugiert. Die Hälfte des Überstandes wurde verworfen, durch 0.15 M KCl ersetzt, homogenisiert und nochmals 60 min bei 100000 g zentrifugiert. Jetzt wurde der Überstand vollständig abgegossen, das Sediment in 0.15 M KCl suspendiert und ein drittes Mal bei 100000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Sediment in 1/15 M Phosphatpuffer pH 7.4 aufgenommen und mit einem Elvehjem-Potter homogenisiert. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die Ansätze wurden auf 1 - 3 mg mikrosomales Protein pro ml verdünnt und gegebenenfalls die Komponenten des NADPH-regenerierenden

Systems zugesetzt: 1.2 mM NADP^+ , 10 mM Glucose-6-phosphat, 100 I.U. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase pro l und 6 mM MgCl_2 in 1/15 M Phosphatpuffer pH 7.4.

Arylamine und Arylhydroxylamine wurden in MeOH, Propioanilide in Aceton gelöst zugegeben (max. 1 Vol.% organisches Lösungsmittel).

Bei Versuchen mit Esterasehemmern wurde Paraoxon in Konzentrationen von 10^{-3} - 10^{-9} M zugesetzt und jeweils 8 min vor Zugabe der Propioanilide inkubiert.

Alle Inkubationen wurden bei 37°C im Schüttelbad durchgeführt.

II. Probenaufarbeitung

1. Analyse von Vollblut, Erythrozyten-Suspensionen und Hämoglobin-Lösungen

Das Blut einer Ratte (ca. 5 ml), die eine Injektion von NOH-4ClA, NOH-4ClAA oder NOH-2AAF erhalten hatte, wurde mit 20 ml eiskaltem dest. Wasser hämolysiert und zweimal mit je 25 ml Ether extrahiert. Inkubate von Rinder- oder Ratten-Erythrozyten wurden mit gleichem Volumen eiskaltem dest. Wasser hämolysiert und zweimal mit je 25 ml Ether extrahiert. Inkubate mit gereinigtem Human-Hämoglobin wurden mit gleichem Volumen eiskaltem dest. Wasser verdünnt und zweimal mit je 25 ml Ether extrahiert. Die Etherphase wurde nach Zentrifugation gewonnen.

Die vereinigten Etherextrakte wurden

- a) mit Hilfe der HPLC untersucht oder
- b) nach Aufnahme des UV-Spektrums im Vakuum zur Trockne gebracht und der Verdampfungsrückstand auf Kieselgel-Platten chromatographiert.

Zur Stabilisierung von autoxidations-empfindlichen Verbindungen wurde die Etherlösung mit Acetanhydrid versetzt, nach 12 h das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und überschüssiges Acetanhydrid mit Methanol abdestilliert.

Um restliches an HbFe^{2+} gebundenes Nitrosoaren zu bestimmen, wurde das zweimal mit Ether extrahierte Hämolysat mit 1 ml 10%iger Kaliumferricyanid-Lösung oxidiert und ein drittes Mal mit Ether extrahiert. Der Ether wurde anschließend mit Hilfe der HPLC analysiert. Zur Nitrosoaren-Bestimmung nach Herr und Kiese (1959) wurde das oxidierte Hämolysat mit CCl_4 extrahiert.

Bei Versuchen mit NOH-4ClAA oder NOH-2AAF wurden die vereinigten Etherextrakte zur Abtrennung nicht umgesetzter N-Arylacetohydroxamsäure zweimal mit 2 M NaOH extrahiert. Der zurückbleibende Ether I wurde wie oben beschrieben analysiert. Die kombinierten alkalischen Auszüge wurden mit 2 M HCl angesäuert und die N-Arylacetohydroxamsäuren mit Ether reextrahiert (Ether II). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der Verdampfungsrückstand in Methanol gelöst. Aus der Extinktion am Absorptionsmaximum im UV wurde die Konzentration der zurückgewonnenen Hydroxamsäure berechnet. Andere saure Verbindungen, die bei dieser Methode auch extrahiert wurden, störten den UV-Nachweis erst in Konzentrationen über 1% der N-Arylacetohydroxamsäuren. In diesen Fällen wurden die N-Arylacetohydroxamsäuren auf Cellulose-Platten mit Cyclohexan/ Eisessig (92.5:7.5) gereinigt, wobei große Verluste von Hydroxamsäure berücksichtigt werden mußten.

Bei Versuchen mit Arylaminen und Erythrozyten wurden neben der hohen Substratkonzentration vergleichsweise niedrige Konzentrationen an Umsetzungsprodukten erwartet. Nach dem Trocknen der Etherextrakte über Natriumsulfat wurde HCl-Gas eingeleitet und der Niederschlag der basischen Bestandteile abzentrifugiert. Das Sediment, das außer dem in großem Überschuß vorliegenden Ausgangsstoff Arylamin auch die evtl. entstandenen Aminophenole enthielt, wurde zwischen 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 und Ether verteilt; die wässrige

Phase wurde mit gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung vermischt und nochmals mit Ether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurden getrocknet und auf Kieselgel-Platten chromatographiert. Durch die Fällung mit HCl war eine Abtrennung von physiologischen Bestandteilen der Erythrozyten erreicht worden, wodurch die chromatographische Trennung von kleinen Mengen Aminophenol neben großem Überschuß Arylamin nicht mehr gestört war. Der Überstand wurde mit wenig gesättigter NaHCO_3 -Lösung neutralisiert und mit Hilfe der HPLC analysiert. Die Etherextrakte der Ansätze mit Anilin wurden mit Acetanhydrid versetzt, mit HPLC analysiert oder nach Entfernen des Lösungsmittels auf Kieselgel-Platten mit Chloroform getrennt, um eine eindeutige Identifizierung der Oxidationsprodukte zu erreichen.

2. Analyse von Mikrosomen-Suspensionen

N- und Ring-Hydroxylierung von Arylaminen und N-Dehydroxylierung von Arylhydroxylaminen: Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Mikrosomen-Suspensionen bzw. aliquote Teile mit gleichem Volumen eiskalten Ethers zweimal extrahiert, die beiden Extrakte vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet und mit Acetanhydrid versetzt. Nach 12 h wurde der Ether im Vakuum abdestilliert und überschüssiges Acetanhydrid nach Zusatz von wenig Methanol abdestilliert. Der Verdampfungsrückstand wurde in Chloroform/Methanol (80:20) aufgenommen, auf Kieselgel-Platten aufgetragen und das Chromatogramm mehrmals mit Chloroform entwickelt. Die N,O-Bisacetate der Arylhydroxylamine und die Acetanilide wurden mit Methanol eluiert. Wenn neben Acetanilid auch N,O-Bisacetate von Aminophenolen vorhanden waren, wurden diese Zonen gemeinsam abgenommen, durch Zusatz von Natriummethylat die O-Acetylgruppe abgespalten und zwischen Ether und 2 M NaOH verteilt. Die Etherphase (mit den Ausgangsverbindungen als Acetanilid) wurde verworfen, die vereinigten alkalischen Auszüge mit 2 M HCl angesäuert und mit Ether reextrahiert. Nach Entfernen des Ethers im Vakuum wurde der Verdampfungsrückstand in Chloroform/Methanol (80:20) gelöst und auf Kieselgel-Platten mit Chloro-

form/Methanol (98:2) chromatographiert. Die Acetaminophenol-Zonen wurden eluiert und ihre Konzentration anhand der Extinktion an einem der beiden Absorptionsmaxima berechnet.

N-Deacylierung von Propioaniliden: Das entstandene Arylamin wurde entweder direkt in der Mikrosomen-Suspension nach Brodie und Axelrod (1948) oder im Etherextrakt nach Acetylierung mit Acetanhydrid als N-Acetylderivat UV-spektroskopisch bestimmt.

III. Analyse der Etherextrakte

1. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Etherextrakte nach Versuchen mit Arylaminen, NOH-4ClA oder NO-4ClB, die Ether I nach Versuchen mit NOH-4ClAA oder NOH-2AAF und die nach Oxidation der Hämolyse mit Kaliumferricyanid gewonnenen Etherextrakte wurden entweder direkt oder als Konzentrate mit Hilfe der HPLC analysiert. Die Konzentration der Metabolite im Etherextrakt wurde anhand der Peakfläche im Vergleich zu definierten Mengen authentischer Verbindungen bei 254 und 280 nm bestimmt.

Folgende Fließmittelgemische wurden verwendet: Methanol/Wasser (70:30) für Derivate von 4ClA (4ClA, 4ClAA, NO-4ClB, NO₂-4ClB) und 2AF-Derivate (2AF, 2AAF, NO₂-2F); Methanol/Wasser (65:35) für 4EA-Derivate (4EA, NO-4EB, NO₂-4EB) und Methanol/Wasser (60:40) für AN-Derivate (AA, NAPAP, NOB, NO₂B).

2. Dünnschichtchromatographie

Die Etherextrakte wurden (bei autoxidationsempfindlichen Verbindungen nach Reaktion mit Acetanhydrid) im Vakuum zur Trockne gebracht, der Verdampfungsrückstand in wenig Chloroform/Methanol

(80:20) aufgenommen und an Kieselgel-Fertigplatten chromatographiert. Nach mehrmaligem Entwickeln in reinem Chloroform oder in Chloroform/Methanol (98:2) wurden die Zonen abgenommen und die adsorbierten Metabolite mit Methanol eluiert. Zur Identifizierung der Metabolite wurden synthetische Verbindungen parallel chromatographiert. Die Quantifizierung der Metabolite erfolgte mit Hilfe des UV-Spektrums. Dazu wurden die in Tab. 1 aufgeführten Extinktionskoeffizienten verwendet.

IV. Bestimmung einzelner Verbindungen

1. 4-Chloranilin und 3,4-Dichloranilin

Die Arylamine wurden nach einer Vorschrift von Brodie und Axelrod (1948) bestimmt.

Aus Inkubaten von NOH-4ClAA mit Rinder-Erythrozyten wurden Proben à 5 ml entnommen und mit 30 ml Toluol (1.5 Vol.% Isoamylalkohol enthaltend) 10 min geschüttelt. Nach Zentrifugation wurden 20 ml der organischen Phase mit 8 ml 0.1 M HCl 10 min geschüttelt und zentrifugiert. Die organische Phase wurde verworfen.

6 ml der Salzsäure-Phase wurden mit 0.5 ml 0.2%iger Natriumnitrit-Lösung versetzt. Nach 10 min wurden 0.5 ml 1%ige Ammoniumsulfamat-Lösung zugegeben, 3 min später 1 ml 50%ige Natriumacetat-Lösung und 0.5 ml 0.2%ige N-(Naphthyl-1-)ethylendiammoniumdichlorid-Lösung. Nach weiteren 20 min wurden 0.5 ml 6 M NaOH zugefügt und der gelbe Farbstoff mit 1-2 ml Toluol/Isoamylalkohol (je nach Konzentration) extrahiert. Nach Zentrifugation wurden 1.8 ml der organischen Phase in eine Halbmikroküvette überführt, mit 0.3 ml 25%iger Trichloressigsäure in Dichlorethan vermischt und die optische Dichte der violetten Lösung bei 570 nm bestimmt. Als Referenz diente ein analog hergestellter Extrakt von Erythrozyten ohne Substrat.

Eichkurven zur Quantifizierung der gemessenen Extinktionen wurden

Tabelle 1 Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten
aromatischer Amine und ihrer Derivate

	λ (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
4-Chloranilin	242	12000
4-Chloracetanilid	248	18700
4-Chlorpropionanilid	248	18600
N-Hydroxy-4-chloranilin	245	12600
N-Hydroxy-4-chloracetanilid	255	14000
Nitroso-4-chlorbenzol	314	12000
Nitro-4-chlorbenzol	270	10700
2-Hydroxy-4-chloracetanilid	247	11350
Bisazoxychlorbenzol *	334	20950
3.4-Dichloranilin	247	18700
3.4-Dichloracetanilid	249	18900
3.4-Dichlorpropionanilid	250	19400
N-Hydroxy-3.4-dichloranilin	249	11950
N-Hydroxy-3.4-dichloracetanilid	259	15300
2-Hydroxy-3.4-dichloracetanilid	248	10100
6-Hydroxy-3.4-dichloracetanilid	248	11700
Acetanilid	239	7200
Phenacetin (4-Ethoxyacetanilid)	249	15200

Die UV-Absorptionsspektren wurden in Methanol bzw. Chloroform (*) aufgenommen.

erhalten, indem bekannte Mengen 4ClA in Erythrozyten-Suspensionen gelöst und wie oben beschrieben als violetter Azofarbstoff bestimmt wurden. Dabei ergab sich ein Faktor von $\Delta E = 0.078$ pro μg 4ClA.

4ClA und 3.4DClA aus Mikrosomen-Suspensionen wurden ohne Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und Rückextraktion in 0.1 M HCl bestimmt. Zu 1 ml der Mikrosomen-Suspension gab man 5 ml 0.1 M HCl und Diazotierungs- und Kupplungsreagenzien wie oben beschrieben.

Entsprechende Eichkurven wurden nach Zusatz und Bestimmung steigender Mengen 4ClA bzw. 3.4DClA zu Mikrosomen-Suspensionen erhalten. Es ergaben sich Faktoren von $\Delta E = 0.275$ pro μg 4ClA und $\Delta E = 0.203$ pro μg 3.4DClA.

Diese Methode erlaubte die Bestimmung von 4ClA und 3.4DClA im Bereich von 0.1-10 μg .

2. Nitroso-4-chlorbenzol und N-Hydroxy-4-chloranilin

NO-4ClB bzw. NOH-4ClA wurden nach der von Herr und Kiese (1959) beschriebenen Methode bestimmt.

1 bis 2 ml Blut, Erythrozyten-Suspension oder Hämoglobin-Lösung, die NO-4ClB oder NOH-4ClA enthielten, wurden mit 8 ml destilliertem Wasser und 0.1 ml 10%iger Kaliumferricyanid-Lösung versetzt, zu 6 ml CCl_4 gegeben und 10 min geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die wässrige Schicht abgenommen und die CCl_4 -Phase zweimal mit je 10 ml 0.025 M H_2SO_4 gewaschen und mit Wasser nachgespült.

Das CCl_4 -Volumen wurde bestimmt, mit 2 ml Eisessig und 1 ml 20%iger Natriumnitrit-Lösung versetzt und gelegentlich umgeschüttelt. Nach 15 min wurden 0.5-1.0 ml 50%ige Ammoniumsulfamat-Lösung zugegeben. Nach weiteren 10 min unter gelegentlichem Schütteln wurde mit Kaliumjodid-Stärkepapier auf nitrose Gase geprüft und bei negativem Ergebnis 0.1ml 0.5%ige N-(Naphthyl-1-)ethylendiammoniumdi-

chlorid-Lösung zugesetzt. Nach zweistündigem Stehen im Dunkeln hatte sich der violette Azofarbstoff in der Eisessig/Wasser-Phase abgeschieden. Das Volumen wurde abgelesen und bei 555 nm die optische Dichte gegen 80%iges Eisessig/Wasser-Gemisch bestimmt.

Durch die Oxidation mit Kaliumferricyanid wurden mit dieser Methode sowohl NO-4ClB als auch NOH-4ClA erfaßt. Da auch NOH-4ClAA bei der Oxidation mit Kaliumferricyanid NO-4ClB liefert, wenn auch nicht quantitativ, gestattet diese Methode keine Differenzierung, solange NOH-4ClAA neben NO-4ClB oder NOH-4ClA vorliegt.

Eichkurven wurden nach Zusatz steigender Mengen NO-4ClB oder NOH-4ClA zu Erythrozyten-Suspensionen wie oben beschrieben bestimmt. Es ergaben sich Faktoren von $\Delta E = 0.071$ pro μg NO-4ClB bzw. NOH-4ClA für die Extraktion aus Erythrozyten-Suspension und von $\Delta E = 0.091$ pro μg NO-4ClB bzw. NOH-4ClA für die Bestimmung in CCl_4 ohne Erythrozyten.

3. 4-Aminophenol

4-Aminophenol wurde als Indophenol nach Brodie & Axelrod (1948) und Mieyal & Blumer (1976) bestimmt.

1 ml Erythrozyten-Suspension wurde mit 0.3 ml 20%iger Trichloressigsäure versetzt. Nach Zentrifugation wurde 1 ml Überstand mit 0.1 ml 5%iger Phenol-Lösung in 2.5 M NaOH-Lösung und mit 0.2 ml 2.5 M Natriumcarbonat-Lösung vermischt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion des gebildeten blauen Farbstoffs bei 630 nm gegen einen Blindwert gemessen, der aus einer Erythrozytensuspension ohne Zusätze auf analoge Weise gewonnen wurde.

Eichkurven wurden anhand der Extinktion des Indophenol-Farbstoffs in Abhängigkeit von der 4-Aminophenol-Konzentration erhalten. Es ergab sich ein Faktor von $\Delta E = 0.156$ pro μg 4-AP (d.h. $\Delta E = 0.017$ pro nmol 4-AP; Mieyal und Blumer (1976) geben $\Delta E = 0.015$ pro nmol 4-AP an).

4. N-Arylacetoxyhydroxamsäuren

Nach Abtrennung von Nitrosoarenen und Arylhydroxylaminen können auch N-Arylacetoxyhydroxamsäuren nach der Methode von Herr & Kiese (1959) bestimmt werden.

Dazu wurden N-Arylacetoxyhydroxamsäuren mit 2 M NaOH aus den Ether-extrakten von Versuchsansätzen ausgeschüttelt, die außerdem noch Nitroso- und Nitroarene, Arylamine und N-Arylacetamide enthielten. Nach dem Ansäuern mit 2 M HCl wurden die Hydroxamsäuren mit Ether reextrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Zusätzlich zur UV-spektroskopischen Bestimmung wurde der Verdampfungsrückstand in CCl_4 gelöst, mit Kaliumferricyanid versetzt und nach der Methode von Herr & Kiese (1959) bestimmt. Da bei der Oxidation von NOH-4ClAA neben NO-4ClB auch das N,O-Bisacetat von NOH-4ClAA entsteht, ist die Ausbeute an Farbstoff geringer als bei NO-4ClB oder NOH-4ClA. Es ergaben sich Faktoren von $\Delta E = 0.002$ pro μg NOH-4ClAA in Erythrozyten-Suspensionen und $\Delta E = 0.009$ pro μg NOH-4ClAA für die Extraktion aus Puffer ohne Erythrozyten.

Eine weitere Quantifizierung von N-Arylacetoxyhydroxamsäuren ist mithilfe der HPLC und einem sauren Fließmittelgemisch (Methanol/Wasser/Eisessig 60:35:5) möglich.

V. Ferrihämoglobin-Bestimmung

1. Cyanid-Methode

Die Konzentration von Ferrihämoglobin in Hämolysaten oder Lösungen gereinigten Hämoglobins wurde mit Hilfe der Extinktionszunahme bei 550 nm nach Zugabe von Kaliumcyanid zur Probenküvette (Kiese, 1974) bestimmt.

Die Konzentration des gesamten Hämoglobins wurde nach vollständiger Oxidation des Hämoglobins durch Kaliumferricyanid nach derselben Methode bestimmt.

Dazu wurden 0.1 - 0.2 ml Blut oder Erythrozyten-Suspension in 10 ml eiskaltem dest. Wasser hämolysiert, mit 1 ml 0.2 M Sörensenpuffer pH 6.6 versetzt und zentrifugiert bzw. 0.1 ml Hämoglobin-Lösung mit 5.5 ml Sörensenpuffer gemischt. Die Extinktionszunahme bei 550 nm nach Zugabe von Kaliumcyanid wurde gemessen, dann wurde Kaliumferriyanid zugesetzt und die Extinktion erneut abgelesen.

Aus der Extinktionsdifferenz bei 550 nm in Anwesenheit von Kaliumferricyanid und Kaliumcyanid wurde durch Multiplikation mit dem Faktor 30.34 bzw. 15.31 für Verdünnung 0.1 bzw. 0.2 auf 11 ml die Konzentration des Hämoglobins in g pro 100 ml erhalten.

2. Spektroskopische Bestimmung bei 630 nm

In verdünnten Hämoglobin-Lösungen bis ca. 0.5 mM HbFe^{2+} wurde die Ferrihämoglobin-Bildung anhand der Extinktionszunahme bei 630 nm verfolgt ($\epsilon = 2.7 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$).

Trotz geringer Empfindlichkeit der Bestimmung der Ferrihämoglobin-Konzentration bei 630 nm wurde diese Methode verwendet, um die Ferrihämoglobin-Bildung in Reaktionsmischungen kontinuierlich verfolgen zu können.

VI. Bestimmung von Enzymaktivitäten

1. Acetylcholinesterase

Die Aktivität der Acetylcholinesterase in Rinder-Erythrozyten wurde nach einer Vorschrift von Ellman et al. (1961) bestimmt.

Ein Maß für die Acetylcholinesterase-Aktivität ist die Extinktionszunahme bei 405 nm durch die Bildung des gelb gefärbten 5-Thio-lat-2-nitrobenzoat-Ions, verursacht durch die Reaktion von 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoat) mit dem aus Acetylthiocholin freigesetzten Thiocholin.

3 ml 50 mM Phosphat-Puffer pH 7.2, der 0.25 mM 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoat) enthielt, wurde mit 0.1 ml einer Acetylthiocholin-jodid-Lösung versetzt. Die Konzentration von Acetylthiocholin in der Probe war damit 5 mM. Nach Zugabe von 0.02 ml Test-Hämolysat (0.4 ml Erythrozyten-Suspension, ca. 10-12g% Hb, verdünnt auf 50ml) wurde nach 1, 2, 3, 4 und 5 min die Extinktionsdifferenz gegenüber einem Leerwert ohne Hämolysat abgelesen. Aus der Extinktionsänderung pro min wurde die Volumenaktivität in U/ml bestimmt ($\epsilon = 13.3 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) und entsprechend dem Hämoglobin-Gehalt die spezifische Aktivität in U/g Hb angegeben.

2. Katalase

In Hämoglobin-Lösungen wurde die Aktivität der zugesetzten Katalase-Menge nach Aebi (1974) anhand der Geschwindigkeit der Extinktionsabnahme bei 240 nm gemessen, die ein Maß für den Verbrauch von H_2O_2 ist.

Zu 1.96 ml 0.05 M Phosphatpuffer pH 7.0 wurden 0.02 ml 1 M H_2O_2 -Lösung und 0.02 ml Probe (0.1 mM HbFe^{2+}) gegeben und die Extinktionsabnahme pro sec bei 240 nm bestimmt. Die Enzymaktivität wurde

entsprechend den Empfehlungen von Aebi in Form der Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten 1.Ordnung, bezogen auf g Hämoglobin, angegeben.

VII. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Biuret-Methode mit Rinderserumalbumin als Standard nach Gornall et al. (1949).

VIII. Bestimmung von Hämoglobin-SH-Gruppen

Die Anzahl der freien SH-Gruppen im Hämoglobin wurde anhand der Extinktionszunahme bei 250 nm nach Reaktion mit pCMB nach Boyer (1954) bestimmt.

Die Hämoglobin-Lösung, über Nacht gegen 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 dialysiert, wurde auf ca. 0.085 g% Hb verdünnt und anschließend ihr genauer Gehalt nach Zusatz von Kaliumferricyanid und Kaliumcyanid anhand der Extinktion bei 540 nm gegen Wasser bestimmt ($\epsilon = 11.5 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$).

Eine knapp 1 mM pCMB-Lösung in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 (pCMB in NaOH gelöst, mit Ammoniumsulfat versetzt) wurde bereitet und ihr genauer Gehalt durch Messung der Extinktion bei 232 nm geprüft ($\epsilon = 16.4 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$).

Die relativ hohe Eigenabsorption von pCMB- und Hämoglobin-Lösung bei 250 nm (der Meßwellenlänge) wurde durch Verwendung von jeweils 2 Küvetten sowohl im Referenz- als auch im Probenstrahl des Photometers kompensiert. Eine der beiden Küvetten enthielt jeweils 3 ml der Hämoglobin-Lösung, die andere je 3 ml 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4. Es wurde durch Zugabe von jeweils 10 μl 1 mM pCMB-Titrier-Lö-

sung zur Hämoglobin-Lösung im Proben- und zur Puffer-Lösung im Referenzfach titriert, bis keine Extinktionszunahme bei 250 nm mehr zu beobachten war. Aus dem Verbrauch an pCMB-Lösung wurde die Anzahl der titrierbaren Hämoglobin-SH-Gruppen bzw. aus der Differenz zur Gesamtzahl die Anzahl der blockierten SH-Gruppen berechnet.

IX. Geräte

Absorptionsspektren im sichtbaren und UV-Bereich wurden mit einem Cary 118 oder 219 der Firma VARIAN (Palo Alto, Calif.) aufgenommen.

Die schnelle Reaktion von NOH-4ClA mit gereinigtem Hämoglobin wurde mit Hilfe eines AMINCO-MORROW Stopped-flow-Gerätes an einem DW2a-Photometer verfolgt.

Extinktionen bei festen Wellenlängen wurden an den Photometern PMQ2 oder PMQ3 der Firma Carl ZEISS (Oberkochen) gemessen.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde mit dem Probeninjektionssystem U6K, der Doppelkolbenpumpe M510 (Durchflußgeschwindigkeit 1.5 - 2 ml/min) und dem Zweistrahl-Mehrwellen-Photometer M440 (254 und 280 nm) der Firma WATERS (Milford, Mass.), einem Schreiber Servogor 2220 von BBC METRAWATT (München) und μ Bondapak C18-Säulen, 0.39x30 cm, ebenfalls von der Firma WATERS, durchgeführt.

NMR-Spektren wurden mit einem VARIAN HA-100, Massenspektren mit einem VARIAN CH7A Massenspektrometer (70 eV) aufgenommen.

Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät nach Dr. Tottoli bestimmt und korrigiert.

ERGEBNISSE

1. In vivo-Versuche mit Ratten

1.1. Ferrihämoglobin-Bildung durch aromatische Amine

Das Ziel der Untersuchungen war, die Ferrihämoglobin-bildende Aktivität bestimmter Arylamine in vivo zu vergleichen. Monocyclische und polycyclische Verbindungen mit verschiedenen Substituenten am aromatischen Ring und unterschiedlicher carcinogener Wirkung sollten unter gleichen Bedingungen an der Ratte getestet werden.

Die getesteten Arylamine AN, 4ClA, 3.4DClA, 4EA, 4ABi und 2AF bildeten nach i.p.-Injektion in Ratten alle HbFe^{3+} . Je nach Konstitution des aromatischen Restes setzte die HbFe^{3+} -Bildung mehr oder weniger schnell ein und erreichte unterschiedlich hohe Maximalkonzentrationen zu verschiedenen Zeiten (Abb. 1).

Am schnellsten und stärksten wirkte 4ABi in einer Dosis von 0.24 mmol/kg (56% HbFe^{3+} nach 75 min), gefolgt von 4ClA (0.26 mmol/kg: 46% HbFe^{3+} nach 60 min) und 4EA (0.15 mmol/kg: 28% HbFe^{3+} nach 30 min).

Während die HbFe^{3+} -Konzentration im Blut nach i.p.-Injektion von 4ABi nur sehr langsam wieder abnahm (in 6 h nach Erreichen der maximalen Konzentration um 10%), hatte sie nach Injektion von 4ClA (in 3 h auf ein Drittel der maximalen Konzentration) und noch deutlicher nach Injektion von 4-EA (2 h nach der maximalen Konzentration kein HbFe^{3+} mehr) sehr viel rascher abgenommen.

Ein zusätzliches Chloratom in m-Stellung verminderte die HbFe^{3+} -bildende Aktivität von 4ClA um mehr als die Hälfte: 3.4DClA oxidierte in einer Dosis von 0.25 mmol/kg 18% des HbFe^{3+} in 60 min. Am schwächsten wirksam waren AN (3.77 mmol/kg: 31% HbFe^{3+} nach 2 h)

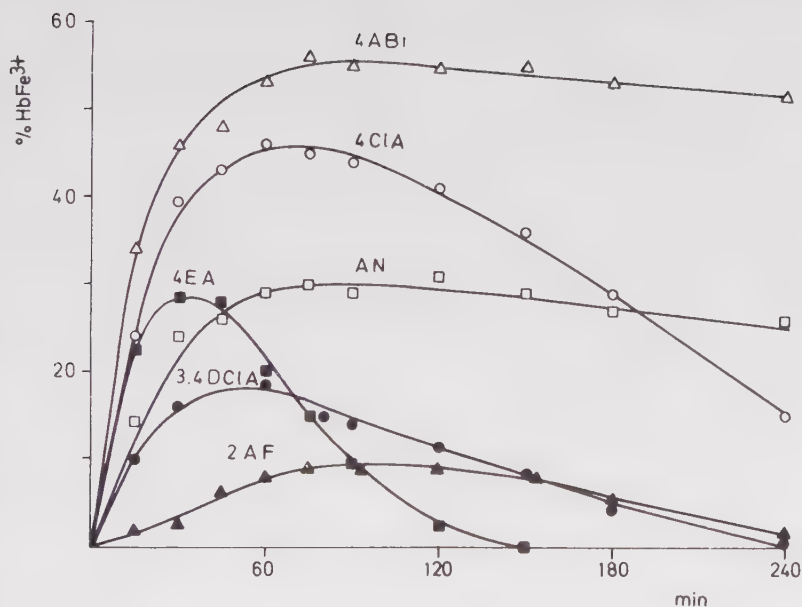


Abb. 1 Ferrihämoglobin-Bildung durch aromatische Amine
in der Ratte

0.26 mmol 4-Chloranilin/kg (○), 0.25 mmol 3.4-Dichloranilin/kg (●), 3.77 mmol Anilin/kg (□), 0.15 mmol 4-Phenetidin/kg (■), 0.24 mmol 4-Aminobiphenyl/kg (Δ), 1.10 mmol 2-Aminofluoren/kg (▲) wurden weiblichen Sprague-Dawley-Ratten i.p. injiziert.

Die Symbole sind Mittel aus Experimenten mit jeweils 3 Tieren.

und 2AF (1.10 mmol/kg: 9% HbFe³⁺ nach 1.5 h). Die HbFe³⁺-Bildung setzte langsam ein, aber die maximal erreichte Konzentration nahm auch nur langsam wieder ab.

Die Anfangsgeschwindigkeit der HbFe³⁺-Bildung nahm in der folgenden Reihenfolge ab: 4AB $\approx$ 4EA $\approx$ 4ClA $\gg$ 3.4ClA > 2AF $\approx$ AN.

1.2. Ferrihämoglobin-Bildung durch Arylhydroxylamine

Da aromatische Amine nach geltender Lehrmeinung (Kiese, 1974) durch Hydroxylierung des Stickstoff-Atoms oder des Benzolrings in vivo erst zu HbFe³⁺-bildenden Verbindungen aktiviert werden, wurden die entsprechenden N-Hydroxy-Derivate der Arylamine synthetisiert und ihre HbFe³⁺-bildende Aktivität unter den gleichen Versuchsbedingungen bestimmt.

Die untersuchten Arylhydroxylamine waren nicht nur wirksamer als die entsprechenden Arylamine, sondern auch die aktivsten HbFe³⁺-bildenden Derivate der Arylamine in vivo, die untersucht wurden. Wie erwartet erzeugten sehr viel kleinere Konzentrationen der Arylhydroxylamine ähnlich hohe HbFe³⁺-Konzentrationen wie die entsprechenden Arylamine (Abb. 2).

Der stärkste HbFe³⁺-Bildner unter den getesteten Arylhydroxylaminen war NOH-4ClA (0.06 mmol/kg: 74% HbFe³⁺ nach 15 min), gefolgt von NOH-AN (0.06 mmol/kg: 66% HbFe³⁺ nach 15 min), NOH-4EA (0.07 mmol/kg: 54% HbFe³⁺ nach 7.5 min) und NOH-4ABi (0.07 mmol pro kg: 52% HbFe³⁺ nach 45 min), dessen Wirkung jedoch deutlich langsamer einsetzte. Ein ähnlich verzögerter Wirkungseintritt war bei NOH-3.4ClA zu beobachten, das nach einer Dosis von 0.06 mmol/kg fast genauso hohe HbFe³⁺-Konzentrationen verursachte wie NOH-4ClA, nämlich 70% HbFe³⁺ nach 30 min. Der schwächste Effekt wurde nach Injektion von 0.07 mmol NOH-2AF/kg beobachtet (nach 15 min maximal 20% HbFe³⁺).

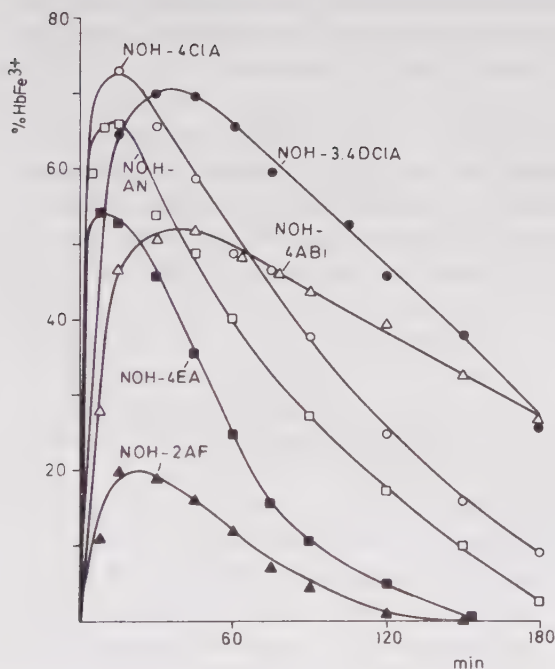


Abb. 2 Ferrihämoglobin-Bildung durch Arylhydroxylamine in der Ratte

0.06 mmol N-Hydroxy-4-chloranilin/kg (○), 0.06 mmol N-Hydroxy-3,4-dichloranilin/kg (●), 0.06 mmol Phenylhydroxylamin/kg (□), 0.07 mmol N-Hydroxy-4-phenetidin/kg (■), 0.07 mmol N-Hydroxy-4-aminobiphenyl/kg (△) und 0.07 mmol N-Hydroxy-2-aminofluoren/kg (▲) wurden weiblichen Sprague-Dawley-Ratten i.p. injiziert.

Die Symbole sind Mittel aus Experimenten mit 3 (NOH-4ClA, NOH-AN, NOH-3,4DCIA) bzw. 6 (NOH-4EA, NOH-4AB1, NOH-2AF) Tieren.

Während die HbFe^{3+} -Konzentration im Blut nach Injektion von NOH-4ClA, NOH-AN und NOH-4EA nach raschem Anstieg auch rasch wieder abnahm, war die Abnahme nach Injektion von NOH-3.4DClA, NOH-2AF und am deutlichsten von NOH-4ABi wesentlich langsamer.

Die größere Aktivität und der praktisch momentan erfolgende Anstieg der HbFe^{3+} -Konzentration sprechen dafür, daß die N-Hydroxy-Derivate von aromatischen Aminen tatsächlich die ultimalen HbFe^{3+} -Bildner sind. Der Effekt der synthetischen N-Hydroxylierung war bei den einzelnen Arylaminen unterschiedlich stark. Die stärkste Wirkungssteigerung wurde bei dem unsubstituierten AN beobachtet, gefolgt von 2AF und 3.4DClA, während die geringste Wirkungssteigerung bei den N-Hydroxy-Derivaten der aktiven Arylamine 4ClA, 4EA und 4ABi zu beobachten war. Die große Wirkungssteigerung bei AN und 3.4DClA durch synthetische N-Hydroxylierung spricht dafür, daß in vivo die N-Hydroxy-Derivate, die starke HbFe^{3+} -Bildner sind, langsam gebildet werden. Die relativ geringe Wirkungssteigerung durch synthetische N-Hydroxylierung von 4ABi, 4EA und 4ClA sprechen für sehr rasche N-Hydroxylierung in vivo und hohe Verfügbarkeit des gebildeten aktiven Metaboliten am Wirkort. Umgekehrt zeigt die schwache HbFe^{3+} -bildende Aktivität von NOH-2AF, daß die geringe Konzentration am Wirkort nicht allein mit einer sehr langsamen N-Hydroxylierung in vivo erklärt werden kann. Das Ergebnis spricht eher für eine sehr geringe Verfügbarkeit von freiem NOH-2AF im Blut.

1.3. Ferrihämoglobin-Bildung durch 2-Aminophenole

Für die Versuche an der Ratte standen die beiden Ring-hydroxylierten Arylamin-Derivate 2-OH-4ClA und 6-OH-3.4DClA zur Verfügung.

Sowohl 2-OH-4ClA als auch 6-OH-3.4DClA erwiesen sich als sehr schlechte HbFe^{3+} -Bildner in der Ratte. Zehnmal so hoch dosiert wie die entsprechenden N-Hydroxy-Derivate, bildeten 0.59 mmol 2-OH-4ClA

pro kg maximal 3% HbFe^{3+} nach 15 min, und nach 90 min war kein HbFe^{3+} im Blut mehr nachweisbar. Nach Injektion von 0.56 mmol 6-OH-3.4DCIA/kg wurden nach 30 min 2% HbFe^{3+} bestimmt, und nach 2 h war kein HbFe^{3+} mehr nachzuweisen.

Die schwache HbFe^{3+} -bildende Aktivität dieser beiden 2-Aminophenole im Vergleich zu den entsprechenden N-Hydroxy-Verbindungen beruht vermutlich auf der raschen Elimination aus dem Blut durch die Konjugation mit Glucuronid oder Sulfat bzw. durch die Reaktion mit Glutathion nach der Oxidation zum Chinonimin (Thioäther-Bildung, s. Eyer & Kiese, 1976).

1.4. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylacetamide

Einen gegenteiligen Effekt auf die HbFe^{3+} -bildende Aktivität von Arylaminen hatte die synthetische N-Acetylierung. Nach i.p.-Injektion von verschiedenen N-Arylacetamiden in Ratten wurde ein sigmoider Verlauf der Kinetik der HbFe^{3+} -Bildung beobachtet. Die maximalen HbFe^{3+} -Konzentrationen waren niedriger und wurden später erreicht als bei den Arylaminen. Ihre Wirkung hielt auch länger an. Diese Befunde bestätigen, daß die N-Arylacetamide in vivo erst zu den eigentlich wirksamen Molekülen aktiviert werden, und zwar durch N-Deacetylierung und anschließende N- oder Ring-Hydroxylierung (Kiese, 1974).

Wie Abb. 3 zeigt, produzierten 0.95 mmol 4AABi/kg in Ratten nach 3 h 58% HbFe^{3+} , ein Wert, der mit nur einem Viertel der Dosis 4ABi bereits nach 75 min erzeugt wurde. 4EAA, von etwa gleicher HbFe^{3+} -bildender Aktivität wie 4AABi, bildete nach Injektion von 0.56 mmol pro kg 33% HbFe^{3+} nach 2 h. Eine fünfmal kleinere Dosis 4EA produzierte diese HbFe^{3+} -Konzentration bereits nach 30 min. Eine Dosis von 0.29 mmol 4ClAA/kg, unter den getesteten N-Arylacetamiden das aktivste, hatte nach 4 h fast 30% HbFe^{2+} oxidiert. Die gleiche Dosis 4ClA oxidierte innerhalb 1 h 46% HbFe^{2+} . Ein Propionyl- statt

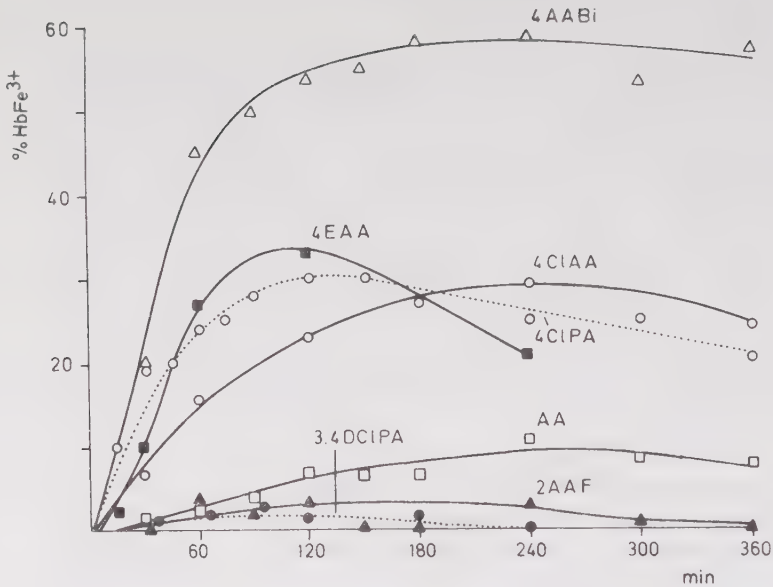


Abb. 3 Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Acylarylamine
in der Ratte

Die N-Arylacetamide 4-Chloracetanilid, 0.29 mmol/kg (○), Acetanilid, 2.58 mmol/kg (□), Phenacetin, 0.56 mmol/kg (■), 4-Acetylamino-biphenyl, 0.95 mmol/kg (△) und 2-Acetylaminofluoren, 0.96 mmol/kg (▲), (durchgezogene Kurven), und die N-Arylpropionamide 4-Chlorpropionanilid, 0.26 mmol/kg (○) und 3.4-Dichlorpropionanilid, 0.26 mmol/kg (●), (durchbrochene Kurven), wurden weiblichen Sprague-Dawley-Ratten i.p. injiziert.

Die Symbole sind Mittel aus Experimenten mit jeweils 3 Tieren.

eines Acetyl-Restes am Stickstoff (4ClPA) bewirkte eine Verminderung der HbFe^{3+} -bildenden Aktivität. 3.4DClPA war noch schwächer wirksam als 4ClPA. Auch AA, in einer Dosis von 2.58 mmol/kg verabreicht, erwies sich als sehr schlechter HbFe^{3+} -Bildner, denn nach 4h wurden nur 10% HbFe^{3+} gemessen. Mit einer den übrigen N-Arylacetamiden vergleichbaren Dosis (0.65 mmol/kg) wurde innerhalb von 3 h nur 1% HbFe^{3+} gebildet. Eine Dosis von 0.96 mmol 2AAF pro kg oxidierte nur 4% des HbFe^{3+} innerhalb 1 h; die äquivalente Dosis 2AF war damit fast doppelt so aktiv.

Die HbFe^{3+} -bildende Wirkung der N-Arylacetamide hielt, abgesehen von 4EAA, auffallend lange an. 7 h nach Injektion von 4AABi wurden z.B. unverändert hohe, nach Injektion von 4ClAA nur wenig niedrigere Konzentrationen von HbFe^{3+} bestimmt. Das spricht für eine langsame Mobilisierung dieser Verbindungen aus der Bauchhöhle, langsame Invasion ins Blut und darauffolgend langsame Metabolisierung zur eigentlich aktiven Molekülspezies in der Leber.

1.5. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylacetohydroxamsäuren

Die synthetische N-Hydroxylierung von N-Arylacetamiden steigerte ihre HbFe^{3+} -bildende Aktivität in der Ratte, doch waren die N-Arylacetohydroxamsäuren wie erwartet schwächer wirksam als die entsprechenden Arylhydroxylamine.

Die dreieinhalbfache Dosis NOH-4ClAA (0.21 mmol/kg) verglichen mit NOH-4ClA war nötig, um etwa die gleiche Wirkung zu erreichen. NOH-AA, NOH-4EAA, NOH-3.4DClAA und NOH-4AABi mußten ungefähr sechs- bis siebenmal so hoch dosiert werden wie die entsprechenden Arylhydroxylamine, um die gleichen HbFe^{3+} -Konzentrationen im Blut zu erzeugen. Sogar die zwölfwache Dosis NOH-2AAF war nötig, um ungefähr die gleiche Wirkung zu beobachten wie nach Injektion von NOH-2AF.

Als die wirksamste unter den getesteten N-Arylacetohy-

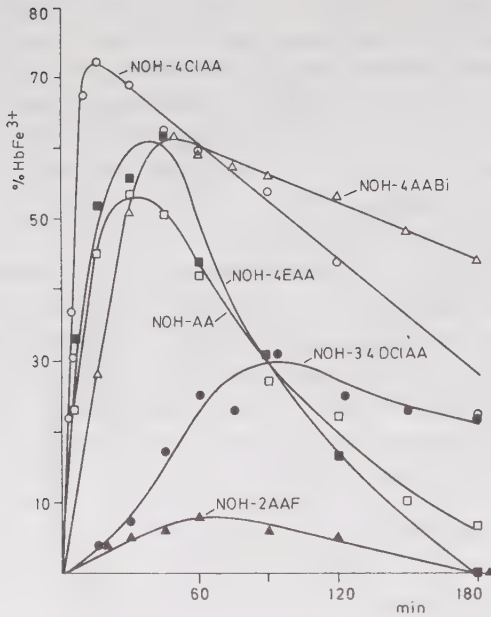


Abb. 4 Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylaceto hydroxamsäuren in der Ratte

0.21 mmol N-Hydroxy-4-chloracetanilid/kg (○), 0.18 mmol N-Hydroxy-3.4-dichloracetanilid/kg (●), 0.33 mmol N-Hydroxy-acetanilid/kg (□), 0.44 mmol N-Hydroxyphenacetin/kg (■), 0.44 mmol N-Hydroxy-4-acetylaminobiphenyl/kg (△), 0.42 mmol N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren/kg (▲) wurden weiblichen Sprague-Dawley-Ratten i.p. injiziert.

Die Marken sind Mittel aus Experimenten mit 3 (NOH-4ClAA, NOH-4EAA, NOH-3.4DClAA), 4 (NOH-AA) bzw. 9 (NOH-4AABi, NOH-2AAF) Tieren.

droxamsäuren erwies sich NOH-4ClAA: Eine Dosis von 0.21 mmol/kg erzeugte nach 15 min 73% HbFe³⁺. Von geringerer Wirksamkeit waren NOH-AA, NOH-4EAA, NOH-3.4DClAA und NOH-4AABi: nach Injektion von 0.33 mmol NOH-AA wurden 53% HbFe³⁺ nach 30 min gefunden, nach 0.44 mmol NOH-4EAA 56% HbFe³⁺ nach 30 min, nach 0.18 mmol NOH-3.4DClAA 31% HbFe³⁺ nach 90 min und nach 0.44 mmol NOH-4AABi 62% HbFe³⁺ nach 90 min. Die durch NOH-3.4DClAA und NOH-4AABi induzierte HbFe³⁺-Bildung setzte langsamer ein. NOH-2AAF war am wenigsten aktiv, denn eine Dosis von 0.42 mmol/kg produzierte nur maximal 8% HbFe³⁺ innerhalb 1 h (Abb. 4).

Durch die N-Arylaceto hydroxamsäuren wurde die maximale HbFe³⁺-Konzentration langsamer gebildet als nach Injektion der entsprechenden Arylhydroxylamine, jedoch sehr viel schneller als nach Injektion der N-Arylacetamide. Das unterstützt die Annahme, daß die N-Arylaceto hydroxamsäuren dem ultimalen HbFe³⁺-bildenden Arylhydroxylamin näher stehen als die N-Arylacetamide.

1.6. Einfluß von Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) auf Ferrihämoglobin- und Nitroso-4-chlorbenzol-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Wenn N-Arylaceto hydroxamsäuren, in Einklang mit der Lehrmeinung (Kiese, 1974), durch enzymatische N-Deacetylierung in vivo in die aktiven Arylhydroxylamine umgewandelt werden, dann müßten Esterase-Inhibitoren die N-Arylaceto hydroxamsäure-induzierte HbFe³⁺-Bildung hemmen. Deshalb wurde die HbFe³⁺-Bildung in vivo nach Injektion von NOH-4ClAA auch in Gegenwart des Esterasehemmers BNPP (Heymann et al., 1969) verfolgt.

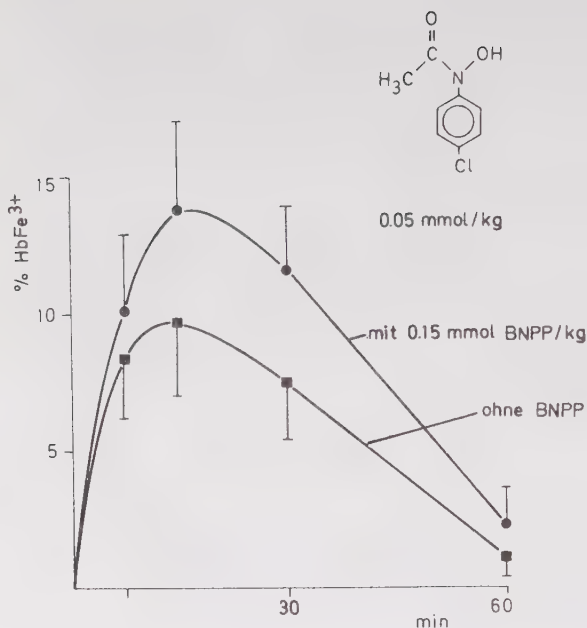


Abb. 5 Einfluß von Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) auf die N-Hydroxy-4-chloracetanilid - induzierte Ferrihämoglobin-Bildung in der Ratte

Weiblichen Sprague-Dawley-Ratten wurde N-Hydroxy-4-chloracetanilid allein (■) bzw. 30 min nach Injektion von Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) (●) injiziert.

Die Marken sind Mittel aus Experimenten mit jeweils 6 Tieren $\pm$ S.E.

1.6.1. Ferrihämoglobin-Bildung

Weil in einem Vorversuch mit 0.27 mmol NOH-4ClAA und 0.15 mmol BNPP pro kg KG keine deutliche Hemmung der HbFe^{3+} -Bildung im Vergleich zu Versuchen ohne BNPP zu sehen war, wurde die Hydroxamsäure-Dosis auf 0.05 mmol/kg reduziert, um einen möglichen Effekt von BNPP eher zu erkennen, wenn die Wirkung von NOH-4ClAA schwächer war.

Jeweils sechs Ratten wurden 0.05 mmol NOH-4ClAA pro kg allein, sechs weiteren Ratten 30 min nach Injektion von 50 mg BNPP pro kg injiziert. Nach drei Tagen wurde ein zweiter Versuch mit den gleichen Tieren durchgeführt; die mit BNPP behandelten Tiere erhielten nun NOH-4ClAA allein und umgekehrt. Ein Vergleich der Mittelwerte der HbFe^{3+} -Konzentration im Blut der Tiere, die mit BNPP behandelt waren, mit der HbFe^{3+} -Konzentration im Blut der Ratten, denen nur NOH-4ClAA injiziert worden war, ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 5). Bei dieser Versuchsreihe wurden sogar etwas höhere Mittelwerte der HbFe^{3+} -Konzentration für die mit BNPP behandelten Ratten ermittelt. Betrachtete man die Ergebnisse der Versuchspaare für jedes einzelne Tier, so ließ sich ebenfalls kein Trend für eine Hemmung der HbFe^{3+} -Bildung durch BNPP erkennen.

1.6.2. Nitroso-4-chlorbenzol-Konzentration

Da die von Heymann et al. (1969) in vivo und in vitro nachgewiesene Hemmung der Esterase-Aktivität durch BNPP auf die NOH-4ClAA-induzierte HbFe^{3+} -Bildung keinen signifikanten Einfluß hatte, wurde die Konzentration von NO-4ClB im Blut von Ratten nach Injektion von NOH-4ClAA mit und ohne vorherige Injektion von BNPP bestimmt. Aus NOH-4ClAA kann durch esteratische Hydrolyse NOH-4ClA entstehen, welches leicht zu NO-4ClB oxidiert wird. Deshalb wurde mit der Methode von Herr & Kiese (1959) die Summe von NOH-4ClA und NO-4ClB bestimmt.

Sechs Ratten erhielten i.p.-Injektionen von 0.27 mmol NOH-4ClAA pro kg, drei davon nach Injektion von 0.15 mmol BNPP pro kg. 10 min nach Injektion der Hydroxamsäure wurde die HbFe^{3+} - und die NO-4ClB-Konzentration im Blut nach Herr & Kiese (1959) bestimmt. Bei den mit BNPP vorbehandelten Tieren fand man mittlere HbFe^{3+} -Konzentrationen von 56% und 9 nmol NO-4ClB pro ml Blut; bei den unbehandelten Tieren wurden dagegen 62% HbFe^{3+} , aber ebenfalls eine mittlere Konzentration von 9 nmol NO-4ClB pro ml Blut bestimmt.

Bei diesen Versuchen war also kein Unterschied in der NO-4ClB-Konzentration zu beobachten, wenn den Ratten zuvor BNPP injiziert wurde. Der Mittelwert der HbFe^{3+} -Konzentration lag bei den mit BNPP behandelten Tieren etwas niedriger.

1.7. Metabolite von N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Bei den Versuchen, Metabolite von NOH-4ClA und NOH-4ClAA nach Etherextraktion des hämolysierten Blutes mithilfe der Dünnschichtchromatographie zu bestimmen, wurde neben Ausgangsmaterial nur 4ClA bzw. 4ClAA gefunden. Mit der HPLC gelang auch die Bestimmung von kleinen Konzentrationen der flüchtigen Verbindungen NO_2 -4ClB und NO-4ClB, die nach Injektion von NOH-4ClA oder NOH-4ClAA entstanden waren.

1.7.1. N-Hydroxy-4-chloranilin

3 min nach Injektion von 0.06 mmol NOH-4ClA pro kg waren 34% HbFe^{3+} gebildet worden. In den Etherextrakten des hämolysierten Blutes wurden mit Hilfe der HPLC nachgewiesen:

NO-4ClB	25 nmol/ml
NO ₂ -4ClB	1 nmol/ml
4ClA	6 nmol/ml
4ClAA	3 nmol/ml

(Mittelwerte aus 3 Versuchen)

1.7.2. N-Hydroxy-4-chloracetanilid

3 min nach Injektion von 0.27 mmol NOH-4ClAA/kg waren 37% des Hämoglobins im Blut der Ratten oxidiert. Nach dem Auftrennen der Inhaltsstoffe der Etherextrakte in saure (II) und neutrale bzw. basische (I) Komponenten wurden mit Hilfe der UV-Spektroskopie 203 nmol NOH-4ClAA pro ml Blut bestimmt. Analyse dieser Etherextrakte II mit HPLC bestätigte das Ergebnis. In den Etherextrakten I wurden mit HPLC nachgewiesen:

NO-4ClB	29 nmol/ml
NO ₂ -4ClB	1 nmol/ml
4ClA	19 nmol/ml
4ClAA	6 nmol/ml

(Mittelwerte aus 3 Versuchen)

4 min nach Injektion von 0.55 mmol NOH-4ClAA pro kg Ratte wurden 60% HbFe³⁺ und 383 nmol NOH-4ClAA pro ml Blut im Etherextrakt II gefunden. Etherextrakt I enthielt:

NO-4ClB	32 nmol/ml
NO ₂ -4ClB	2 nmol/ml
4ClA	43 nmol/ml
4ClAA	12 nmol/ml

(Mittelwerte aus 2 Versuchen)

Diese Versuche zeigten, daß nach der doppelten Dosis NOH-4ClAA fast doppelt so viel Ferrihämoglobin gebildet wurde. Die Konzentra-

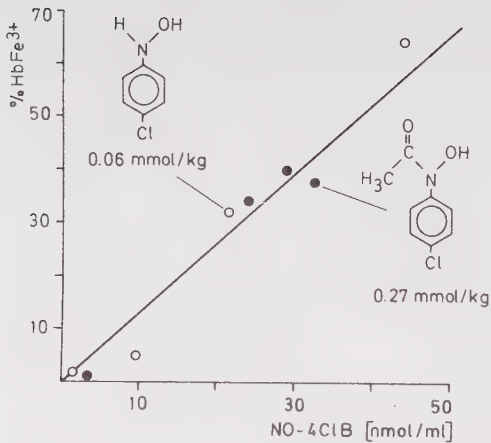


Abb. 6 Beziehung zwischen Ferrihämoglobin- und Nitroso-4-chlorbenzol-Konzentration im Blut der Ratte durch N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid

N-Hydroxy-4-chloranilin (o) und N-Hydroxy-4-chloracetanilid (●) wurden weiblichen Sprague-Dawley-Ratten i.p. injiziert.

tion von NOH-4ClAA, NO₂-4ClB, 4ClA und 4ClAA im Blut war nach 4 min ungefähr doppelt so hoch, während die NO-4ClB-Konzentration nicht proportional zunahm, ein Hinweis, daß der aktive Ferrihämoglobin-bildende Metabolit rasch wieder aus dem Blut eliminiert wird.

Aus den Ergebnissen der Versuche mit dem Arylhydroxylamin und der N-Arylacetohydroxamsäure wurde berechnet, daß nach Injektion von 0.06 mmol NOH-4ClA pro kg 1.4% HbFe³⁺ pro nmol NO-4ClB und nach Injektion von 0.27 mmol NOH-4ClAA pro kg 1.3% HbFe³⁺ pro nmol NO-4ClB im Blut der Ratten gefunden wurden. Unabhängig von der injizierten Substanz wurden also bei gleichen HbFe³⁺-Konzentrationen auch gleiche NO-4ClB-Konzentrationen nachgewiesen. NOH-4ClAA mußte aber höher dosiert werden als NOH-4ClA, um eine gleich starke Wirkung zu erzeugen. Abb. 6 zeigt eine lineare Korrelation von HbFe³⁺- und NO-4ClB-Konzentration sowohl nach Injektion von 0.06 mmol NOH-4ClA pro kg als auch nach Injektion von 0.27 mmol der N-acetylierten Verbindung NOH-4ClAA pro kg (im Bereich von 0 - 66% HbFe³⁺). Daraus wurde geschlossen, daß bei der NOH-4ClAA-induzierten HbFe³⁺-Bildung in vivo NOH-4ClA das eigentlich aktive HbFe³⁺-bildende Agens ist.

1.8. Metabolite von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren

Das Produktmuster nach Injektion von NOH-4ClAA, einer monocyclischen Hydroxamsäure mit hoher HbFe³⁺-bildender und nicht bewiesener kanzerogener Wirkung (Fischbach et al., 1982), sollte verglichen werden mit dem nach Injektion von NOH-2AAF, einer polycyclischen Hydroxamsäure mit nur geringer HbFe³⁺-bildender, dafür aber hoher kanzerogener Aktivität (Wilson et al., 1941).

0.42 mmol NOH-2AAF pro kg wurde Ratten i.p. injiziert. Nach 4, 30, 60, 75 und 94 min wurden die in Tab. 2 aufgeführten Konzentrationen von 2AF, 2AAF und NO-2F bzw. NO₂-2F per HPLC gefunden. Eine Unter-

Tabelle 2 Ferrihämoglobin-Bildung und Metabolite durch
N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren in der Ratte

Ratte Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
t (min)	4	4	30	30	60	60	75	94
HbFe ³⁺ (%)	0	0	0	3.9	0	1.1	3.0	3.3
NOH-2AAF (nmol/ml)	5	10	9	22	4	2	4	7
2AF (nmol/ml)	<1	<1	-	<1	7.0	1.2	23.5	22.3
2AAF (nmol/ml)	0.5	0.4	0.5	2.8	3.0	2.2	10.5	9.7
NO/NO ₂ -2F (nmol/ml)	*)	*)	-	*)	*)	*)	*)	*)

Weiblichen Sprague-Dawley-Ratten wurde 0.42 mmol N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren pro kg KG i.p. injiziert und das Blut der Tiere nach der oben angegebenen Zeit analysiert.

*) NO-2F und NO₂-2F waren bei dem verwendeten Fließmittel (Methanol/Wasser 70:30) im HPLC-Chromatogramm nicht getrennt und deshalb nicht quantifizierbar.

scheidung zwischen $\text{NO}_2\text{-2F}$ und NO-2F war mit dem verwendeten Fließmittelgemisch nicht möglich. Da jedoch die Summe der $\text{NO}_2\text{-2F}$ - und NO-2F -Konzentrationen sehr klein war, wurde auf eine weitere Auftrennung verzichtet, zumal NO-2F leicht zu $\text{NO}_2\text{-2F}$ autoxydiert wird.

Bereits 3 min nach Injektion von 0.27 mmol NOH-4ClAA pro kg wurde die HbFe^{3+} -Bildung beobachtet und meßbare Konzentrationen von Ausgangsmaterial NOH-4ClAA und den Metaboliten NO-4ClB , $\text{NO}_2\text{-4ClB}$, 4ClA und 4ClAA gefunden. Dagegen setzte die Wirkung nach Injektion von 0.42 mmol NOH-2AAF pro kg viel langsamer ein. Erst 30 min nach Injektion der polycyclischen Hydroxamsäure wurden niedrige HbFe^{3+} -Konzentrationen gefunden. Auch die Konzentration des Ausgangsmaterials NOH-2AAF und der Metabolite NO-2F bzw. $\text{NO}_2\text{-2F}$, 2AF und 2AAF im Blut nahm langsamer zu als nach Injektion einer kleineren Dosis NOH-4ClAA .

2. In vitro-Versuche mit Erythrozyten

Die Ferrihämoglobin-Bildung in Erythrozyten-Suspensionen *in vitro* wurde untersucht, um den Einfluß der Leber und anderer Organe auszuschließen und die Fähigkeit des isolierten Erythrozyten zur metabolischen Aktivierung von Arylaminen und ihren Derivaten zu prüfen. Eine solche Untersuchung sollte zeigen, welche biochemischen Reaktionen mit der Enzymsausstattung des Erythrozyten beobachtet werden.

2.1. Ferrihämoglobin-Bildung durch aromatische Amine

Die bisher gültige Lehrmeinung war, daß aromatische Amine Hämoglobin *in vitro* nicht oxidieren können, sondern erst nach einer Aktivierung zu N- und/oder Ring-hydroxylierten Derivaten durch hepatische oder extrahepatische Enzyme. Die Reaktionen von aromatischen Aminen wurden in Suspensionen von Rindererythrozyten (10 mM HbFe^{2+}) in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer in Gegenwart von 11 mM Glucose bei pH 7.4 und 37°C untersucht. Dabei wurde beobachtet, daß bei Konzentrationen von 16-17 mM Arylamin entweder ein langsamer Anstieg oder nach einer lag - Phase ein rascher Anstieg der HbFe^{3+} -Konzentration erfolgte, je nach der Konstitution des Arylamins (Abb. 7).

In den Experimenten mit 4ClA und 3.4DClA wurde innerhalb der ersten 75 bzw. 45 min nur ein langsamer Anstieg der HbFe^{3+} -Konzentration beobachtet, während danach eine sehr schnelle Zunahme der HbFe^{3+} -Konzentration bis auf über 90% des Gesamtblutfarbstoffs zu sehen war. Die sigmoide Form der Kinetik spricht für einen autokatalytischen Prozeß der Hämoglobin-Oxidation.

Dagegen zeigte die Kinetik der HbFe^{3+} -Bildung durch AN oder 4EA ein ganz anderes Bild: die HbFe^{3+} -Konzentration stieg im Verlauf von Stunden langsam und stetig an: 50% HbFe^{3+} wurden nach 5h Inkubation von 17 mM 4EA bei 37°C gemessen. Noch geringer war die Wir-

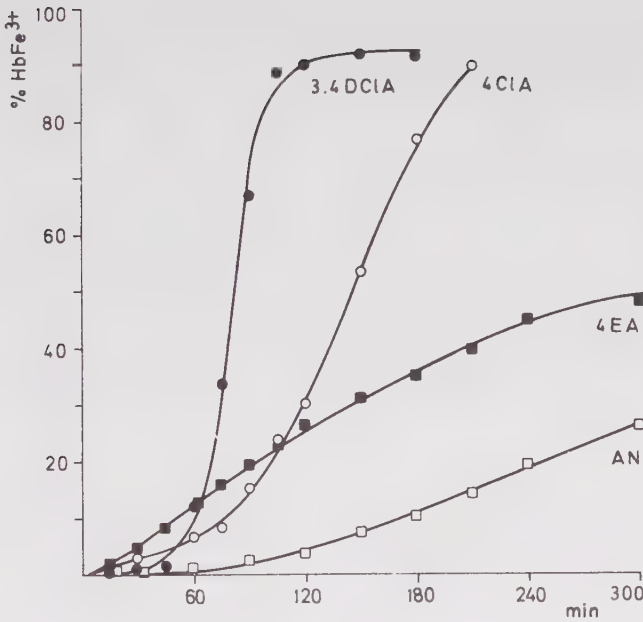


Abb. 7 Ferrihämoglobin-Bildung durch aromatische Amine
in Erythrozytensuspensionen vom Rind

Gewaschene Rindererythrozyten (10 mM HbFe^{2+} , in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) wurden mit 16 mM Anilin ($\square$), $17 \text{ mM 4-Phenetidin}$ ($\blacksquare$), $16 \text{ mM 4-Chloranilin}$ ($\circ$) und $16 \text{ mM 3,4-Dichloranilin}$ ($\bullet$) bei 37°C inkubiert (jeweils ein typisches Experiment).

kung von 16 mM AN auf die Oxidation des Hämoglobins, denn die HbFe^{3+} -Konzentration stieg im Verlauf von 5 h bei 37°C nur auf 26% an. Innerhalb dieses langsamen Anstiegs war zu Beginn ein sigmoider Verlauf zu erkennen.

Die beiden polycyclischen Arylamine 4ABi und 2AF waren dagegen so schwach wirksam, daß durch 120 mM 4ABi nach 7 h nur 15% HbFe^{3+} und durch 110 mM 2AF nach 5 h sogar nur 2% HbFe^{3+} gebildet wurden; der Verlauf der HbFe^{3+} -Bildung ist daher in der Abb. 7 nicht wiedergegeben.

Weil der sigmoide Verlauf der Kinetik der HbFe^{3+} -Bildung durch aromatische Amine auf einen autokatalytischen Prozeß hinweist, wurde ein Versuch mit 4ClA und Erythrozyten durchgeführt, bei dem 4.5% des Hämoglobins schon zu Beginn des Versuchs als HbFe^{3+} vorlagen. Durch diesen Versuch wurde geprüft, ob kleine HbFe^{3+} -Konzentrationen katalytisch wirksam sind und die Form der Kinetik verändern.

Zur Oxidation des Hämoglobins wurden 2 ml Suspension von Rindererythrozyten mit Natriumnitrit versetzt und darauf fünfmal mit Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer gewaschen, um überschüssiges Natriumnitrit wieder zu entfernen. Diese oxidierte Erythrozyten-Suspension wurde mit 18 ml unbehandelter Erythrozyten-Suspension gemischt und enthielt dann 8.0 mM HbFe^{2+} + HbFe^{3+} . Nach Bestimmung des HbFe^{3+} -Gehalts (4.5%) wurde 5.6 mM 4ClA zugesetzt. Parallel dazu wurde ein Versuch mit HbFe^{3+} -freier Erythrozyten-Suspension (9.3 mM HbFe^{3+}) und 5.6 mM 4ClA durchgeführt. Der Anstieg der HbFe^{3+} -Konzentration zeigte jedoch in beiden Ansätzen den gleichen Verlauf. In dem Versuch mit 4.5% HbFe^{3+} war jeder Meßwert um etwa diese HbFe^{3+} -Menge erhöht gegenüber dem Versuch mit unbehandelter Erythrozyten-Suspension. Nach 3 h waren in dem Versuch ohne zugesetztes HbFe^{3+} 45% des Hämoglobins oxidiert, in dem Versuch mit 4.5% HbFe^{3+} dagegen 52% (Abb. 8).

Aus diesem Versuchsergebnis wurde geschlossen, daß die autokata-

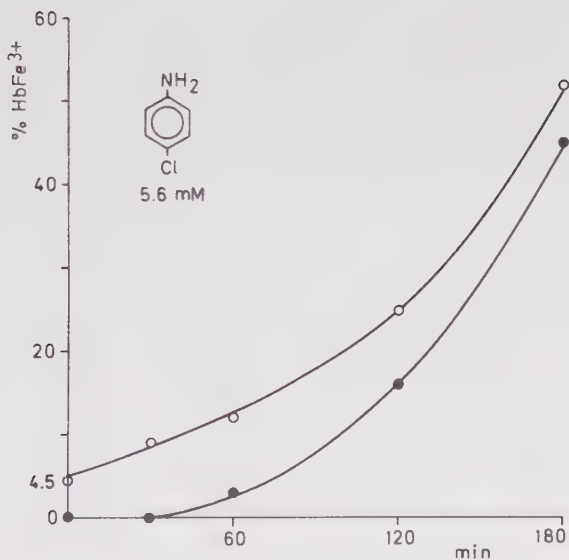


Abb. 8 Ferrihämoglobin-Bildung durch 4-Chloranilin
in Erythrozytensuspensionen vom Rind

Gewaschene Rindererythrozyten, suspendiert in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4 (mit 11 mM Glucose) wurden mit 4-Chloranilin bei 37°C inkubiert (jeweils ein typisches Experiment).

- Erythrozyten ohne Ferrihämoglobin (9.3 mM HbFe²⁺)
- Erythrozyten mit 4.5% Ferrihämoglobin (8.0 mM GesamtHb)

lytische Beschleunigung der HbFe^{3+} -Bildung nicht durch HbFe^{3+} erfolgt, wenn HbFe^{2+} und HbFe^{3+} in verschiedenen Zellen vorliegen.

2.2. Reaktionsprodukte aromatischer Amine

Da Arylamine auch in Erythrozyten-Suspensionen Hämoglobin oxidierten, wurde untersucht, ob bei der Autoxidation von Oxyhämoglobin aus den Arylaminen N- und C-oxygenierte Produkte entstehen, die die Ferrihämoglobin-Bildung beschleunigen.

2.2.1. 4-Chloranilin

16 mM 4ClA wurde mit Rindererythrozyten (10 mM HbFe^{2+}), suspendiert in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, bei 37°C in Gegenwart von 11 mM Glucose inkubiert. Nach 75 min stieg die HbFe^{3+} -Konzentration rasch an, und nach 3.5 h waren 77% HbFe^{3+} gebildet. Die Reaktionsmischung wurde hämolysiert und das Hämolysat dreimal mit Ether extrahiert. In diesen Etherextrakten wurden neben 62% unverändertem 4ClA (entsprechend 9.7 mM) mit HPLC insgesamt 7.4 μM NO-4ClB (0.05%) und 2.0 μM NO_2 -4ClB (0.01%) bestimmt. Die Etherextrakte wurden einzeln analysiert, um die kleinen NO-4ClB- und NO_2 -4ClB-Konzentrationen im ersten Extrakt nicht durch weitere Extrakte noch mehr zu erniedrigen.

Aus den vereinigten Etherextrakten wurden die basischen Bestandteile mit HCl-Gas gefällt und im Überstand nach NO-4ClB und NO_2 -4ClB gesucht, aber nicht gefunden; im Niederschlag wurden, neben unverändertem 4ClA, 31.6 μM 2-OH-4ClA (0.2%) bestimmt. Nach dünn-schicht-chromatographischer Trennung von 4ClA und Verunreinigungen wurde die 2-OH-4ClA enthaltende Zone isoliert und nach Reaktion mit Acetanhydrid rechromatographiert. Dabei wurden 2 Zonen, das N-Acetat und das N,O-Bisacetat von 2-OH-4ClA gewonnen und deren Konzen-

tration aus der Extinktion beim Absorptionsmaximum berechnet. Die durch Vergleich von Retentionszeit (HPLC), R_F -Wert (DC) und Gestalt des UV-Spektrums in neutralem und alkalischem Methanol mit den entsprechenden Daten für die authentische Verbindung gesicherte Konstitution, wurde zusätzlich durch das mit Hilfe der Massenspektrometrie gewonnene Molgewicht gestützt.

Daneben wurde im ersten Dünnschichtchromatogramm in kleinen Mengen eine gelb gefärbte Verbindung gefunden, aus deren UV-Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 237, 297 und 420 nm auf ein Phenoxazon geschlossen wurde. Wegen der sehr geringen Ausbeute war die Aufklärung seiner Struktur aber nicht möglich.

2.2.2. 3.4-Dichloranilin

16 mM 3.4-DC1A wurde mit Rindererythrozyten (10 mM HbFe^{2+}) bei 37°C inkubiert. Bereits nach 45 min stieg die HbFe^{3+} -Konzentration steil an, und nach 60 min waren 86% des Hämoglobins oxidiert. Die Reaktionsmischung wurde hämolysiert und das Hämolysat dreimal mit Ether extrahiert. In diesen Etherextrakten wurden, neben unverändertem 3.4DC1A, mit HPLC insgesamt 14.6 μM NO-3.4DC1B (0.09%) und 7.2 μM NO₂-3.4DC1A (0.04%) gefunden.

Nach Fällung der basischen Bestandteile der vereinigten Etherextrakte durch Einleiten von HCl-Gas wurden im Niederschlag neben 3.4DC1A 11.8 μM 6-OH-3.4DC1A (0.07%) und 9.9 μM 2-OH-3.4DC1A (0.06%) gefunden. Ring-Hydroxylierung des 3.4DC1A in o-Stellung zur Aminogruppe führte zu den beiden isomeren o-Aminophenolen 2-OH-3.4DC1A und 6-OH-3.4DC1A. Inkubierte man bei Raumtemperatur entsprechend längere Zeit, fand man ein anderes Molverhältnis der beiden Phenole: 16.0 μM 6-OH-3.4DC1A (0.1%) und 7.0 μM 2-OH-3.4DC1A (0.04%). Im Überstand konnten keine definierten Produkte nachgewiesen werden.

Nach Auftrennen des Niederschlags mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurden die 6-OH-3.4DC1A und 2-OH-3.4DC1A enthaltenden Zonen gewonnen und nach Reaktion mit Acetanhydrid rechromatographiert. Aus diesen Chromatogrammen wurden jeweils das N-Acetat und das N,O-Bisacetat von 2-OH-3.4DC1A und 6-OH-3.4DC1A isoliert und deren Konzentrationen aus der Extinktion beim Absorptionsmaximum berechnet. Die Struktur der beiden o-Aminophenole, die aus dem Vergleich der Retentionszeiten (HPLC), der R_F -Werte (DC) und der UV-Spektren in neutralem und alkalischem Methanol mit den entsprechenden Daten für die authentischen Verbindungen gesichert worden war, wurde zusätzlich durch das mit Hilfe der Massenspektrometrie gewonnene Molekulargewicht gestützt.

Außerdem wurde im ersten Dünnschichtchromatogramm eine gelb gefärbte Verbindung beobachtet, deren UV-Spektrum (Absorptionsmaxima bei 243, 417 und 438 nm) auf ein substituiertes 2-Amino-phenoxazin-3-on hinwies. Das Massenspektrum der Verbindung bestätigte die Summenformel $C_{12}H_5Cl_3N_2O_2$ und zeigte außerdem das charakteristische Isotopenmuster für drei Chloratome im Molekül (Molekülpeak bei 314/316/318/320 im Verhältnis 27:27:9:1). Vermutlich hatte sich durch Kondensation von zwei Molekülen 2-OH-3.4DC1A oder von einem 2-OH- und einem 6-OH-3.4-DC1A das 4.6.7- bzw. das 4.7.8-Trichlor-2-amino-phenoxazin-3-on gebildet.

In Kontrollexperimenten mit den gleichen Konzentrationen 4ClA bzw. 3.4DC1A in Puffer allein waren unter den gleichen Versuchsbedingungen keine Autoxidationsprodukte dieser Arylamine nachzuweisen.

2.2.3. 4-Phenetidin

Nach 22stündiger Inkubation einer Erythrozyten-Suspension (10 mM $HbFe^{3+}$) mit 16 mM 4EA bei 37°C wurden 66% $HbFe^{3+}$ bestimmt. In den Etherextrakten des Hämolyсата wurde mit HPLC neben Verunreinigungen nur nicht umgesetztes 4EA wiedergefunden. NO-4EB und NO₂-4EB wurden

zwar gefunden, bildeten sich aber auch in Inkubaten mit Puffer.

Nach Fällung der basischen Metabolite der vereinigten Etherextrakte durch Einleiten von HCl-Gas und Auftrennung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde sowohl im Niederschlag als auch im Überstand Phenacetin (ca. 0.75% der Arylamin-Konzentration) gefunden. Dieses durch Vergleich von R_F -Wert und UV-Spektrum mit authentischem 4EA erhaltene Ergebnis wurde durch das Massenspektrum der Verbindung bestätigt.

Außerdem wurden nach dünn-schicht-chromatographischer Auftrennung der Bestandteile der vereinigten Etherextrakte 67 μM NO-4EB (0.5%) gefunden. Allerdings waren auch im Kontrollexperiment mit Puffer durch Autoxidation des 4EA bereits 50 μM NO-4EB (0.3%) entstanden. Ring-hydroxylierte Derivate des 4EA konnten nicht nachgewiesen werden.

2.2.4. Anilin

Nach 22stündiger Inkubation einer Erythrozyten-Suspension (10 mM HbFe^{2+}) mit 16 mM AN bei 37°C wurden 41% HbFe^{3+} gefunden. In den Etherextrakten des Hämolysats wurden mit HPLC NOB und NO_2B nur in Spuren (max. 0.6 μM , d.h. weniger als 0.01% des Ausgangsmaterials) bestimmt. Vom eingesetzten AN wurden nach dieser langen Inkubationszeit nur 1.94 mM (12.1 %) als AA wiedergefunden. Daneben wurden 35 μM 4-AP (0.24%) als N-Acetyl-Derivat bestimmt. Wurde 4-AP mit Hilfe der Indophenol-Reaktion nachgewiesen, erhielt man höhere Konzentrationen, bis zu 0.7% (entsprechend 110 μM) des eingesetzten AN (s.a. Blisard & Mieyal, 1979).

Kontrollversuche mit AN in Puffer ergaben keine Hinweise auf definierte Autoxidationsprodukte.

Messung der Autoxidation des Hämoglobins in intakten Rinderery-

Tabelle 3a

Bildung von Ferrihämoglobin und von N- und Ring-oxygenierten Produkten aus aromatischen Aminen
in Erythrozytensuspensionen

Arylamin	N-oxygenierte Produkte	Ring-oxygenierte Produkte	HbFe ³⁺	t
4-Chloranilin	7.4 µM Nitroso-4-chlorbenzol 2.0 µM Nitro-4-chlorbenzol	31.6 µM 2-Hydroxy-4-chloranilin	77%	210 min
3,4-Dichloranilin	14.6 µM Nitroso-3,4-dichlorbenzol 7.2 µM Nitro-3,4-dichlorbenzol	11.8 µM 2-Hydroxy-3,4-dichloranilin 9.9 µM 6-Hydroxy-3,4-dichloranilin	86%	60 min
Anilin	0.4 µM Nitrosobenzol 0.2 µM Nitrobenzol	35.0 µM 4-Aminophenol	66%	22 h
4-Phenetidin	17 µM 4-Nitrosophenetol		41%	22 h

Gewaschene Rindererythrozyten (10 mM HbFe²⁺, in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) wurden mit jeweils 16 mM Arylamin bei 37°C inkubiert (Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchen).

Tabelle 3b Ferrihämoglobin-Bildung durch N- und Ring-Hydroxy-Derivate aromatischer Amine
in Erythrozytensuspensionen

N-hydroxylierte Derivate	HbFe ³⁺	Ring-hydroxylierte Derivate	HbFe ³⁺	t
5.1 µM N-Hydroxy-4-chloranilin	60%	50 µM 2-Hydroxy-4-chloranilin	70%	210 min
25 µM N-Hydroxy-3,4-dichloranilin	43%	70 µM 6-Hydroxy-3,4-dichloranilin	59%	60 min
77 µM Phenylhydroxylamin	70%	75 µM 4-Aminophenol	8%	60 min
50 µM N-Hydroxy-4-phenetidin	7%			60 min

Die synthetisch N- und Ring-hydroxylierten Derivate der aromatischen Amine wurden in den angegebenen Konzentrationen mit gewaschenen Rindererythrozyten (8-12 mM HbFe²⁺, in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) bei 37°C inkubiert.

throzyten unter den gegebenen Versuchsbedingungen lieferte innerhalb der durchgeführten Inkubationszeiten keine meßbare Ferrihämoglobin-Konzentration.

Da die Ferrihämoglobin-bildende Aktivität von NOH-4ClA, NOH-3,4-DClA, NOH-4EA und von 2-OH-4ClA, 6-OH-3,4DClA und 4-AP auch in Erythrozyten-Suspensionen in vitro gemessen wurde (s. 2.4 und 2.6), kann die nach der Inkubation der Arylamine gemessene Konzentration dieser N- und Ring-hydroxylierten Derivate jeweils die HbFe^{3+} -Konzentration in der Erythrozyten-Suspension erklären (Tab. 3).

2.3. Beziehung zwischen Ferrihämoglobin- und 4-Aminophenol-Bildung aus Anilin

In einer Suspension von Rindererythrozyten (10 mM HbFe^{2+}) wurde bei 37°C in Gegenwart von 11 mM Glucose die Kinetik der HbFe^{3+} - und der 4-AP-Bildung aus 16 mM AN gemessen. Aufgrund der langen Inkubationsdauer (27 h) wurden die Versuche in zwei Abschnitten durchgeführt. Bei der ersten Gruppe wurden HbFe^{3+} - und 4-AP-Konzentration von Beginn an 10 h lang, dann nach einer Pause von 15 h weitere 3 h lang bestimmt. Bei der zweiten Gruppe von Versuchen wurde die Messung 10 h nach Substratzugabe begonnen und nach weiteren 12 h beendet.

4-AP- und HbFe^{3+} -Konzentration stiegen zunächst parallel an. Nach 15 h erreichte die 4-AP-Konzentration ein Maximum, zu einem Zeitpunkt, als bereits über 70% des Hämoglobins oxidiert waren. Von da an nahm die HbFe^{3+} -Konzentration sehr viel langsamer auf max. 90% zu, die 4-AP-Konzentration dagegen wieder ab (Abb. 9a).

Um diese Abnahme mit der Stabilität von 4-AP unter den Versuchsbedingungen zu vergleichen, wurde eine Lösung von 92 μM 4-AP (ent-

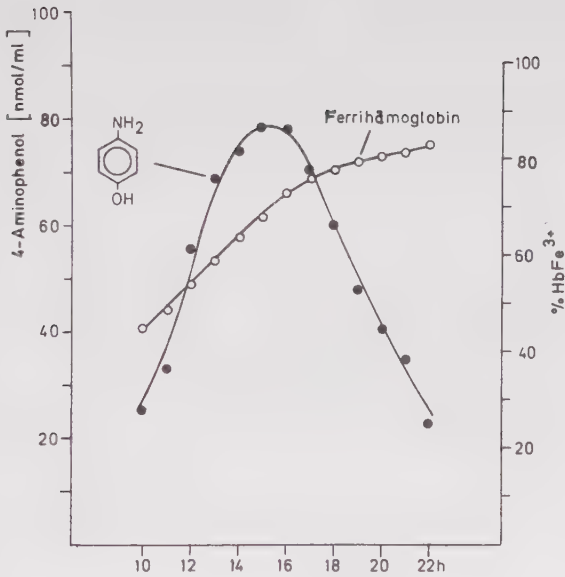


Abb. 9a Ferrihämoglobin- und 4-Aminophenol-Bildung durch Anilin in Erythrozytensuspensionen vom Rind

Gewaschene Rindererythrozyten (10 mM HbFe²⁺, in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) wurden mit 16 mM Anilin bei 37°C inkubiert (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

- Ferrihämoglobin-Konzentration
- 4-Aminophenol-Konzentration

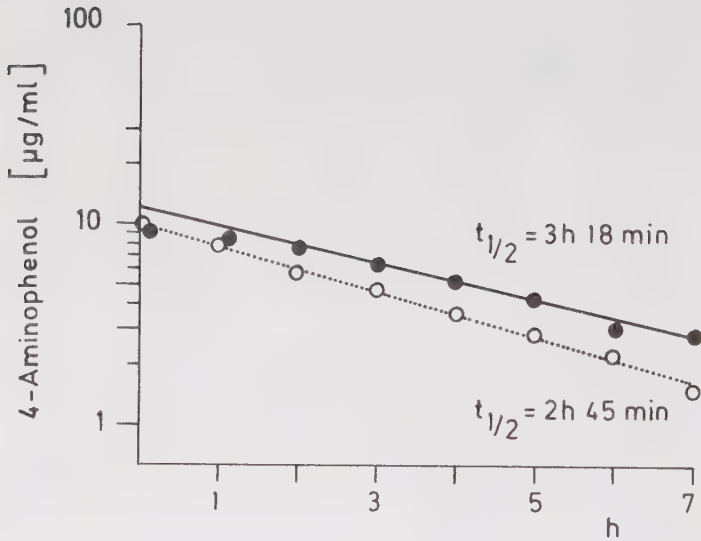


Abb. 9b Zerfall von 4-Aminophenol

92 μM synthetisches 4-Aminophenol (○) wurde in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4 bei 37°C inkubiert (.....).

Zum Vergleich ist die Abnahme von aus Anilin gebildetem 4-Aminophenol (●) in Rindererythrozyten (s. Abb. 9a) eingezeichnet (——). Die Symbole sind Mittel aus 3 Experimenten.

sprechend der maximalen Konzentration, die in der Erythrozytensuspension bestimmt wurde) in Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung pH 7.4 7 h bei 37°C inkubiert. Die 4-AP-Konzentration wurde alle 60 min mit Hilfe der Indophenol-Reaktion bestimmt. Abb. 9b zeigt, daß der Zerfall von 4-AP in Puffer schneller erfolgte als die in Erythrozytensuspension beobachtete Abnahme von 4-AP. Wurden die ermittelten 4-AP-Konzentrationen logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, ergaben sich Geraden, aus denen Halbwertszeiten von 2 h 45 min für den Zerfall von synthetischem 4-AP in Puffer und von 3 h 18 min für die Abnahme von aus AN gebildetem 4-AP in Erythrozytensuspension berechnet wurden.

Diese Ergebnisse zeigten, daß die Abnahme der 4-AP-Konzentration, die in der Erythrozyten-Suspension (Abb. 9a) gemessen wurde, eine Überlagerung von langsamerer Bildung aus AN und Zersetzung war.

Kiese & Schneider (1955) fanden, daß die Geschwindigkeit der Hb-Autoxidation auch von der HbFe^{3+} -Konzentration abhängig ist. Bei 75% oxidiertem Hb verlief die Autoxidation z.B. nur noch halb so schnell, denn mit zunehmender HbFe^{3+} -Konzentration wird die Affinität des restlichen HbFe^{2+} zum Sauerstoff immer höher. So wird auch verständlich, daß sowohl die Geschwindigkeit der HbFe^{3+} -Bildung durch AN, als auch die der 4-AP-Bildung in der Erythrozyten-Suspension immer mehr abnahm.

2.4. Ferrihämoglobin-Bildung durch Arylhydroxylamine

Da Arylhydroxylamine als aktive HbFe^{3+} -bildende Metabolite von Arylaminen in vivo nachgewiesen wurden (Kiese, 1959a; 1959c), wurde der Effekt der synthetischen N-Hydroxylierung von Arylaminen auf die Geschwindigkeit der HbFe^{3+} -Bildung auch in Erythrozyten-Suspensionen in vitro untersucht.

Die Arylhydroxylamine NOH-AN, NOH-4ClA, NOH-3.4DC1A, NOH-4EA, NOH-

4ABi und NOH-2AF erwiesen sich auch in vitro in Erythrozyten-Suspensionen als die am schnellsten und stärksten wirksamen HbFe^{3+} -Bildner, vergleichbar nur mit den o-Aminophenolen (s. 2.7.).

Wie schon in den in-vivo-Experimenten war NOH-4ClA auch in Erythrozyten-Suspensionen in vitro der stärkste HbFe^{3+} -Bildner unter den getesteten Arylhydroxylaminen (Abb. 10). In einer Konzentration von 25 μM wurden innerhalb von 2 h 93% des Hämoglobins in Erythrozyten-Suspensionen oxidiert. Selbst in einer Konzentration von nur 5 μM NOH-4ClA wurden innerhalb von 5 h 70% HbFe^{3+} gebildet. Das entsprach bei einer Konzentration von 8.3 mM HbFe^{2+} in der Erythrozyten-Suspension 5.8 mM HbFe^{3+} , also über 1000 mol oxidiertes Eisen pro mol NOH-4ClA.

25 μM NOH-3.4DClA reagierte langsamer als die Monochlorverbindung mit Hämoglobin in Erythrozyten in vitro, denn nach 4 h waren erst 75% des Hämoglobins oxidiert. Nach Zusatz von 5 μM NOH-3.4DClA zu Erythrozyten (8.3 mM HbFe^{2+}) wurden innerhalb von 4 h 30% HbFe^{3+} gebildet, die 500 Äquivalenten Fe^{3+} pro mol NOH-3.4DClA entsprachen.

Ein Zusatz von 25 μM NOH-4ABi zu Rindererythrozyten (8.2 mM HbFe^{2+}) oxidierte innerhalb von 2 h 65% des Hämoglobins, das entsprach 200 Äquivalenten oxidiertem Eisen pro mol NOH-4ABi.

Setzte man den Rindererythrozyten (11.6 mM HbFe^{2+}) 77 μM NOH-AN zu, fand man nach 2 h 83% HbFe^{3+} , also 125 mol oxidiertes Eisen pro mol NOH-AN.

NOH-2AF oxidierte in einer Konzentration von 25 μM nur maximal 22% des Hämoglobins in Erythrozyten-Suspensionen (8.2 mM) innerhalb 1 h, das waren nur 70 mol oxidiertes Eisen pro mol NOH-2AF.

Nach Zusatz von 350 μM NOH-4EA zu Erythrozyten-Suspensionen wurden nach 45 min nur 24% HbFe^{3+} bestimmt. 50 μM NOH-4EA oxidierte innerhalb von 1 h 7% des Hämoglobins in Erythrozyten (8.1 mM HbFe^{2+}). Daraus wurde eine katalytische Aktivität von nur 5 mol Hb-Fe^{2+} pro mol NOH-4EA bestimmt.

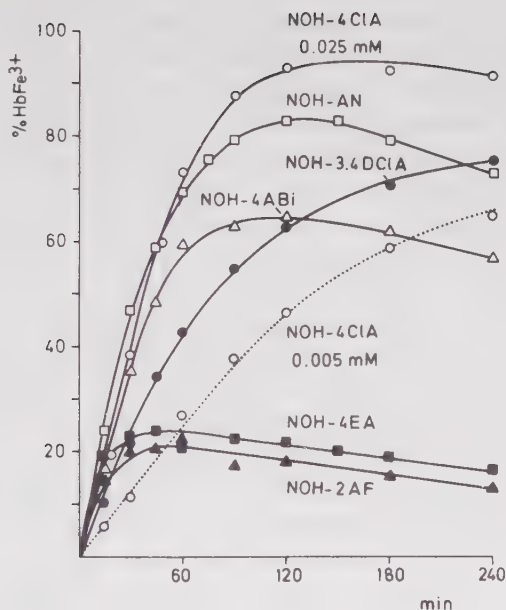


Abb. 10 Ferrihämoglobin-Bildung durch Arylhydroxylamine
in Erythrozytensuspensionen vom Rind

Gewaschene Rindererythrozyten ($8 - 12 \text{ mM HbFe}^{2+}$, in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) wurden mit N-Hydroxy-4-chloranilin ($\bigcirc$), 0.025 mM (durchgezogene Kurve) bzw. 0.005 mM (durchbrochene Kurve), 0.025 mM N-Hydroxy-3.4-dichloranilin ($\bullet$), 0.077 mM Phenylhydroxylamin ($\square$), 0.35 mM N-Hydroxy-4-phenetidin ($\blacksquare$), 0.025 mM N-Hydroxy-4-aminobiphenyl ($\triangle$) und 0.025 mM N-Hydroxy-2-aminofluoren ($\blacktriangle$) bei 37°C inkubiert (jeweils ein typisches Experiment).

Fe^{3+} pro mol NOH-4EA berechnet.

Diese Versuche zeigen, daß Arylhydroxylamine mehr als die stöchiometrische Menge HbFe^{3+} in Erythrozyten oxidiert haben, Indikation für ihre katalytische Aktivität. Diese Fähigkeit zur katalytischen Oxidation von Hämoglobin erlangen die Arylhydroxylamine durch wiederholte metabolische Regeneration, wenn sie nach einem Reaktionscyclus zu Nitrosoarenen oxidiert worden sind. Die Versuche zeigen aber auch, daß große Unterschiede in der katalytischen Aktivität der getesteten Verbindungen bestehen, ein Hinweis auf unterschiedliche Reaktivität im oxidierten oder reduzierten Zustand.

Suspensionen von Rindererythrozyten (9 mM HbFe^{2+}) wurden mit 5.6 mM NOH-4ClA oder NOH-3.4DClA bei 37°C inkubiert (Verhältnis HbFe^{2+} zu Arylhydroxylamin 2:1). Abb. 11 zeigt, daß bei so hohen Arylhydroxylamin-Konzentrationen die HbFe^{3+} -Konzentration in den Suspensionen sofort nach Zugabe des Substrats auf ca. 50% anstieg. Pro mol Arylhydroxylamin war ein Äquivalent HbFe^{3+} gebildet worden. Anschließend nahm aber die HbFe^{3+} -Konzentration nur noch sehr langsam zu. Bei diesen hohen Arylhydroxylamin-Konzentrationen war praktisch keine katalytische Aktivität der Verbindungen zu beobachten. Die Ursache war vermutlich eine massive Schädigung der Erythrozyten, wodurch eine Reaktivierung der Arylhydroxylamine durch NADPH- oder NADH-abhängige Diaphorasen nicht mehr möglich war. Wagner et al. (1968) fanden, daß 5 mM NOH-AN den Glucose-Stoffwechsel in Suspensionen menschlicher Erythrozyten hemmt und wiesen eine Hemmung der SH-Enzyme bei diesen hohen Arylhydroxylamin-Konzentrationen nach. Sie führten dies auf den Abfall der Konzentration von reduziertem Glutathion zurück, der der Enzymhemmung vorangeht.

Außerdem muß berücksichtigt werden, daß bei diesen hohen Arylhydroxylamin-Konzentrationen durch die Co-Oxidation auch hohe Nitrosoaren-Konzentrationen entstehen, die mit dem restlichen HbFe^{2+} den Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplex bilden, so daß die Konzentration von freiem HbFe^{2+} sehr klein wird. Die auf die schnelle Anfangsreaktion folgende langsame HbFe^{3+} -Bildung könnte mit einer langsamen Weiteroxidation des Nitrosoaren- HbFe^{2+} -Komplexes erklärt werden.

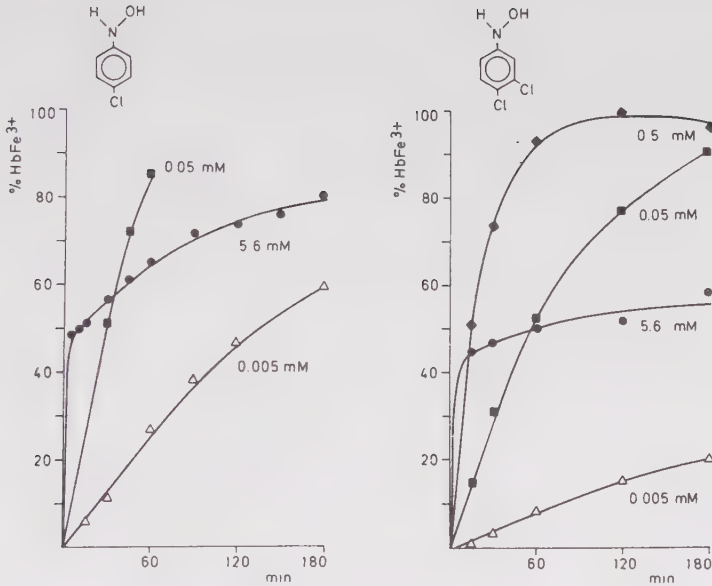


Abb. 11 Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-3,4-dichloranilin in Erythrozytensuspensionen

Gewaschene Rindererythrozyten (9 mM HbFe^{2+} , in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) wurden mit verschiedenen Konzentrationen N-Hydroxy-4-chloranilin (Abb. links) und N-Hydroxy-3,4-dichloranilin (Abb. rechts) bei 37°C inkubiert (jeweils ein typisches Experiment).

2.5. Einfluß von Glucose und Lactat auf die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin

Wie Kiese et al. (1950) mit Phenylhydroxylamin gezeigt haben, ist das exogene Substrat Glucose nötig, damit Phenylhydroxylamin in Erythrozyten-Suspensionen metabolisch regeneriert wird und immer wieder mit Hämoglobin reagieren kann. Dadurch wird mehr als die stöchiometrische Menge Ferrihämoglobin gebildet. Das bei der gekoppelten Oxidation von Oxyhämoglobin und Phenylhydroxylamin entstehende Nitrosobenzol wird durch eine NADPH-abhängige Diaphorase so lange zu Phenylhydroxylamin reduziert und in den katalytischen Cyclus der Hämoglobin-Oxidation eingeschleust, bis entweder alles HbFe^{2+} oxidiert oder kein Arylhydroxylamin mehr verfügbar ist.

Dieser Versuch wurde mit NOH-4ClA, dem aktivsten der getesteten Arylhydroxylamine, wiederholt (Abb. 12).

2.5.1. N-Hydroxy-4-chloranilin in Rindererythrozyten-Suspensionen

Suspensionen von Rindererythrozyten (9 mM HbFe^{2+}) wurden mit 10 μM NOH-4ClA bei 37°C in Gegenwart von 11 mM Glucose inkubiert. Die HbFe^{3+} -Konzentration nahm innerhalb von 3 h auf 85% zu. Setzte man statt der Glucose 18 mM Lactat zu, fand man nach 3 h nur 10% HbFe^{3+} und ohne Zusatz von Glucose oder Lactat 15% HbFe^{3+} (Abb. 12). Diesen HbFe^{3+} -Konzentrationen entsprachen in Gegenwart von Glucose 730 Äquivalente HbFe^{3+} pro mol NOH-4ClA, in Gegenwart von Lactat nur 90 mol HbFe^{3+} , und ohne jeden Zusatz 140 mol HbFe^{3+} pro mol NOH-4ClA. Die katalytische HbFe^{3+} -Bildung durch NOH-4ClA in Erythrozyten in vitro wird also nur durch den Abbau der Glucose über den Pentose-Phosphat-Weg stimuliert. Das bedeutet, daß die für die Regenerierung von NOH-4ClA verantwortlichen Reduktasen in den Rindererythrozyten NADPH als Cofaktor benötigen. Aber auch ohne Zusatz von Glucose reagierte NOH-4ClA mehr als einmal mit HbFe^{2+} , denn gewaschene Erythrozyten enthalten endogene Substrate für die Unterhaltung des reduktiven Stoffwechsels, die nur durch mehrstündige Inkubation ohne exogene Glucose verbraucht werden (Uehleke, 1973).

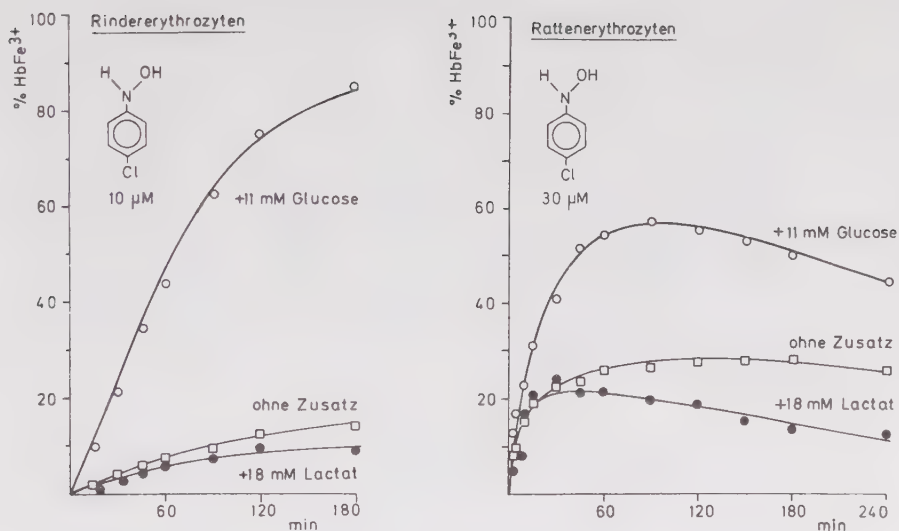


Abb. 12 Einfluß von Glucose und Lactat auf die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin in Erythrozyten

N-Hydroxy-4-chloranilin wurde mit gewaschenen Erythrozyten, suspendiert in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4 ohne Zusätze (□), mit 11 mM Glucose (○) oder mit 18 mM Lactat (●), bei 37°C inkubiert.

Abb. links: Rindererythrozyten, 9 mM HbFe²⁺ (jeweils 1 Versuch)

Abb. rechts: Rattenererythrozyten, 8-9 mM HbFe²⁺ (jeweils 2 Versuche)

2.5.2. N-Hydroxy-4-chloranilin in Rattenerithrozyten-Suspensionen .

Diese ausgeprägte Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von NOH-4ClA von exogener Glucose war in Versuchen mit Rattenerithrozyten weniger deutlich zu beobachten (Abb. 12).

Zu Suspensionen von Rattenerithrozyten in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4 (8-9 mM HbFe²⁺) wurde 30 µM NOH-4ClA gegeben. Diese Konzentration wurde gewählt, weil NOH-4ClA in Rattenerithrozyten schwächer wirksam war als in Rindererythrozyten. In Gegenwart von 11 mM Glucose wurden nach 90 min bei 37°C 58% HbFe³⁺ gemessen, die einer katalytischen Aktivität von 165 mol HbFe³⁺ pro mol NOH-4ClA entsprachen. Setzte man den Erythrozyten anstelle der Glucose 18 mM Lactat zu, so fand man maximal 23% HbFe³⁺ nach 30 min und nur noch 20% HbFe³⁺ nach 90 min. Dieses Ergebnis entsprach einem Verhältnis von 67 mol HbFe³⁺ pro mol NOH-4ClA. Ohne Zusatz von Glucose oder Lactat bestimmte man nach 90 min 27% HbFe³⁺; das entsprach 74 mol oxidiertem Eisen pro mol NOH-4ClA.

Die Ergebnisse zeigen, daß die katalytische Aktivität von NOH-4ClA in Suspensionen von Rindererythrozyten in Gegenwart von Glucose größer war als in Suspensionen von Rattenerithrozyten. Der Unterschied zur Reaktion in Gegenwart von Lactat oder ohne Zusätze ist deshalb bei Erythrozyten vom Rind deutlicher als bei der Ratte. Das könnte bedeuten, daß die reduzierenden Enzyme der Rindererythrozyten eine größere Affinität zu NO-4ClB haben als die der Rattenerithrozyten. Zusatz von Lactat scheint die katalytische Aktivität von NOH-4ClA in Suspensionen von Rinder- und Rattenerithrozyten sogar zu hemmen.

Im Gegensatz zu Erythrozyten-Suspensionen ohne Additive nahm die HbFe³⁺-Konzentration in Gegenwart von Glucose oder Lactat nach Erreichen eines Maximums wieder ab, ein Hinweis, daß die erythrozytären Ferrihämoglobin-Reduktasen Glucose und Lactat utilisieren, ohne daß aber auf dem Lactat-Weg reduzierende Äquivalente auf Nitrosoarene übertragen werden. Bei den Versuchen mit Rindererythrozyten

konnte diese Wirkung von Lactat nicht beobachtet werden, weil möglicherweise die Konzentration des Ferrihämoglobin-Bildners und damit des Ferrihämoglobins bereits zu hoch und die reduzierende Kapazität erschöpft war. Die Wirkung des Arylhydroxylamins war schneller als die Reduktion des Ferrihämoglobins durch die Enzyme der Erythrozyten. Auch eine raschere Metabolisierung des aktiven Moleküls in Rattenerythrozyten ist denkbar.

2.6. Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-4-chloranilin

Suspensionen von Rindererythrozyten (9 mM HbFe^{2+}) wurden nach 2-, 30- und 67minütiger Inkubation mit NOH-4ClA bei 37°C analysiert. Wie Tab. 4 zeigt, wurden in den Ätherextrakten der Hämolysate mit Hilfe der HPLC neben Ausgangsmaterial (NOH-4ClA und NO-4ClB wurden gemeinsam als NO-4ClB bestimmt) auch $\text{NO}_2\text{-4ClB}$ und 4ClA gefunden. Setzte man statt des Arylhydroxylamins 1.0 mM NO-4ClB der Erythrozyten-Suspension zu, fand man ähnliche Konzentrationen von HbFe^{3+} , NO-4ClB , $\text{NO}_2\text{-4ClB}$ und 4ClA . Nach Kiese et al. (1950) kann anstelle von NOH-4ClA auch NO-4ClB zur Oxidation von HbFe^{2+} eingesetzt werden, da es metabolisch zu NOH-4ClA reduziert wird. Die Konzentration des Reduktionsprodukts 4ClA war allerdings mit NO-4ClB als Substrat geringer als mit NOH-4ClA , da für die Bildung von 4ClA aus NO-4ClB doppelt so viel reduzierende Äquivalente nötig sind wie zur Reduktion von NOH-4ClA . Die niedrigen $\text{NO}_2\text{-4ClB}$ -Konzentrationen sind möglicherweise durch Autoxidation von NO-4ClB entstanden, wofür auch Kontrollversuche mit NO-4ClB in Puffer sprechen.

2.7. Ferrihämoglobin-Bildung durch Aminophenole

Die Kinetik der Ferrihämoglobin-Bildung durch 2-OH-4ClA, 6-OH-3,4DClA, 2-AP und 4-AP wurde in Suspensionen von Rindererythrozyten untersucht, um die HbFe^{3+} -bildende Aktivität einiger Ring-hydroxy-

Tabelle 4 Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-4-chloranilin und Nitroso-4-chlorbenzol in Erythrozytensuspensionen

t (min)	2		30		67	
Substrat	NOH-4CLA	NO-4CLB	NOH-4CLA	NO-4CLB	NOH-4CLA	NO-4CLB
HbFe ³⁺ (%)	30.1	22.3	68.4	64.4	85.9	83.8
NO-4CLB (μM)	373.9	401.2	293.3	318.9	187.2	216.7
(%)	(39.8)	(40.1)	(31.2)	(31.9)	(19.9)	(21.7)
NO ₂ -4CLB (μM)	6.8	7.9	6.8	8.2	7.3	7.2
(%)	(0.7)	(0.8)	(0.7)	(0.8)	(0.8)	(0.7)
4CLA (μM)	20.8	12.9	34.4	25.8	52.2	36.4
(%)	(2.2)	(1.3)	(3.7)	(2.6)	(5.6)	(3.6)

Gewaschene Rindererythrozyten (9mM HbFe²⁺, in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4 mit 11 mM Glucose) wurden mit 0.94 mM N-Hydroxy-4-chloranilin bzw. 1.0 mM Nitroso-4-chlorbenzol bei 37°C inkubiert (Mittelwerte aus jeweils 2 Experimenten).

lierter Arylamine in vitro kennenzulernen und mit den entsprechenden N-Hydroxy-Derivaten zu vergleichen.

2-AP erwies sich als ein stärker wirksamer HbFe^{3+} -Bildner als 4-AP. In einer Konzentration von 75 μM oxidierte 2-AP innerhalb von 3 h 67% des Hämoglobins einer Rindererythrozyten-Suspension (12 mM HbFe^{2+}), 4-AP unter den gleichen Bedingungen dagegen nur 15%. Die maximale HbFe^{3+} -Konzentration wurde durch 4-AP schon nach 2.5 h erreicht (Abb. 13).

2-OH-4ClA bildete etwas schneller HbFe^{3+} als 2-AP. 74 μM 2-OH-4ClA oxidierte in einer Suspension von Rindererythrozyten (12 mM HbFe^{2+}) innerhalb von 3 h 73% des Hämoglobins. 77 μM 6-OH-3.4DClA oxidierte im gleichen Zeitraum 83% des Hämoglobins und war damit noch etwas stärker wirksam als die entsprechende Monochlorverbindung. Aus diesen Ergebnissen wurde eine katalytische Aktivität von 105 mol HbFe^{3+} pro mol 2-AP, 115 mol HbFe^{3+} pro mol 2-OH-ClA und 125 mol HbFe pro mol 6-OH-3.4DClA berechnet.

Beim Vergleich der Kinetik der HbFe^{3+} -Bildung durch o-Aminophenole (Abb. 13) und Arylhydroxylamine (Abb. 10) zeigte sich, daß die N-Hydroxy-Derivate aromatischer Amine Hämoglobin in Erythrozyten in vitro nicht viel schneller oxidierten als die entsprechenden o-hydroxylierten Derivate, ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen in vivo.

77 μM NOH-3.4DClA oxidierte Hämoglobin zunächst kaum schneller als eine gleiche 6-OH-3.4DClA-Konzentration. Nach 15 min waren 25 bzw. 18% HbFe^{3+} , nach 30 min 40 bzw. 35% HbFe^{3+} entstanden. NOH-3.4DClA erzeugte jedoch später höhere maximale HbFe^{3+} -Konzentrationen als 6-OH-3.4DClA. Nach 2 h hatte NOH-3.4DClA 95%, 6-OH-3.4DClA dagegen nur 76% und nach 4 h 84% des Hämoglobins oxidiert.

NOH-AN bildete in gleicher Konzentration wie 2-AP schneller HbFe^{3+} . Nach 15 min wurden durch NOH-AN 24%, durch 2-AP nur 12% HbFe^{3+} gebildet. Nach 2 h hatte NOH-AN 83% des Hämoglobins oxidiert, 2-AP nach 3 h 67%.

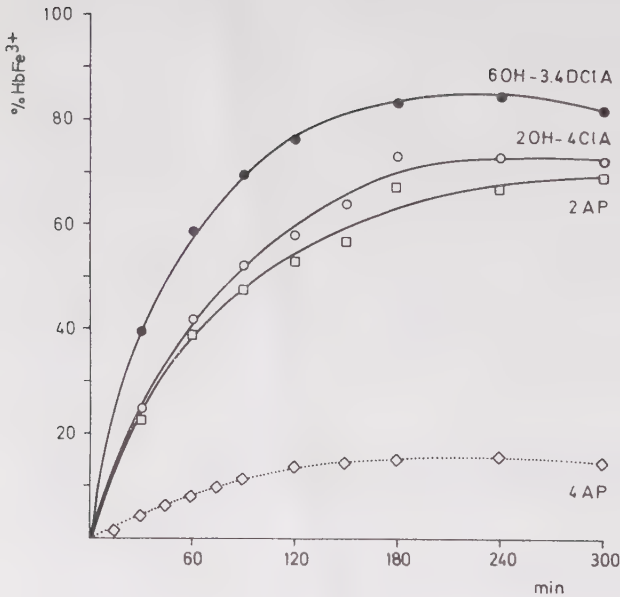


Abb. 13 Ferrihämoglobin-Bildung durch Aminophenole
in Erythrozytensuspensionen vom Rind

Gewaschene Rindererythrozyten (12 mM HbFe^{2+} , in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) wurden mit 0.074 mM 2-Hydroxy-4-chloranilin ($\circ$), 0.077 mM 6-Hydroxy-3,4-dichloranilin ($\bullet$), 0.075 mM 2-Aminophenol ($\square$) und 0.075 mM 4-Aminophenol ($\diamond$) bei 37°C inkubiert (jeweils ein typisches Experiment).

NOH-4ClA war in Erythrozyten-Suspensionen ein stärkerer HbFe^{3+} -Bildner als 2-OH-4ClA. Die Anfangsgeschwindigkeit der HbFe^{3+} -Bildung war mehr als doppelt so groß wie beim Ring-hydroxylierten Derivat des 4ClA. Nach 1 h waren 80% des Hämoglobins in den Erythrozyten durch $73 \mu\text{M}$ NOH-4ClA oxidiert. 2-OH-4ClA produzierte in der gleichen Konzentration erst nach 4 h 73% HbFe^{3+} . Während $5 \mu\text{M}$ NOH-4ClA innerhalb von 5 h 70% des Hämoglobins oxidierten, erzeugte die gleiche 2-OH-4ClA-Konzentration innerhalb von 7 h nicht mehr als 1% HbFe^{3+} .

Diese Unterschiede in der Kinetik der HbFe^{3+} -Bildung zwischen N-OH- und Ring-OH-Derivaten aromatischer Amine beruhen vermutlich auf unterschiedlichen Geschwindigkeiten bei der Regeneration des aktiven HbFe^{3+} -bildenden Agens. Sie werden verständlich, wenn man berücksichtigt, daß unterschiedliche Mechanismen die katalytische Aktivität von Arylhydroxylaminen und Aminophenolen bedingen. Arylhydroxylamine können durch enzymatische Reduktion der Nitrosoarene viele Äquivalente HbFe^{2+} oxidieren, während die Katalyse der HbFe^{2+} -Oxidation durch Aminophenole nicht-enzymatisch über Phenoxylradikale bzw. Chinonimine als aktive HbFe^{3+} -bildende Zwischenstufen abläuft (Eyer et al., 1974; Eyer & Lengfelder, 1984).

Während aber die HbFe^{3+} -bildende Aktivität von N-Hydroxy- und Ring-Hydroxy-Derivaten aromatischer Amine in der Ratte sehr unterschiedlich war, erwiesen sich die getesteten o-Aminophenole in Rindererythrozyten in vitro als ähnlich wirksame HbFe^{3+} -Bildner wie die entsprechenden Arylhydroxylamine. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die schwache HbFe^{3+} -bildende Aktivität von 2-OH-4ClA und 6-OH-3,4DClA in vivo vermutlich durch ihre rasche Elimination aus dem Blut verursacht wird.

2.8. Ferrinämoglobin-Bildung durch N-Arylacetamide

Konzentrationen von 15 mM des monocyclischen 4ClAA und 9 mM des

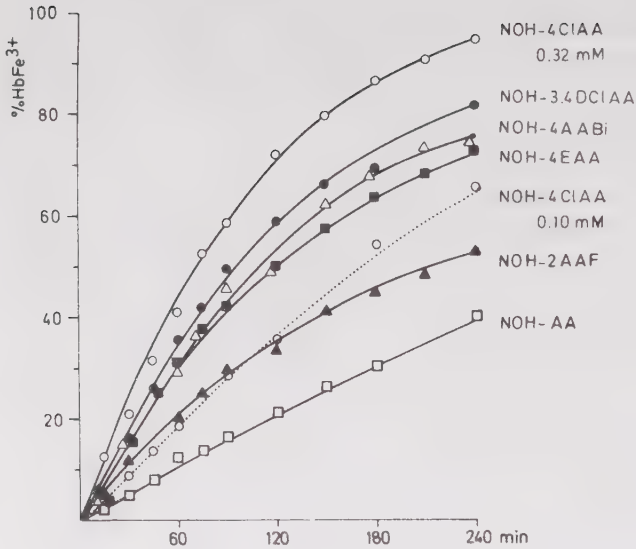


Abb. 14 Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylacetohydroxamsäuren in Erythrozytensuspensionen vom Rind

Gewaschene Rindererythrozyten ($8-10 \text{ mM HbFe}^{2+}$, in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) wurden mit N-Hydroxy-4-chloracetanilid ($\circ$), 0.32 mM (durchgezogene Kurve) und 0.10 mM (durchbrochene Kurve), 0.48 mM N-Hydroxy-3,4-dichloracetanilid ($\bullet$), 0.32 mM N-Hydroxyacetanilid ($\square$), 0.62 mM N-Hydroxyphenacetin ($\blacksquare$), 0.54 mM N-Hydroxy-4-acetylamino-biphenyl ($\triangle$) und 42 mM N-Hydroxy-2-acetylamino-fluoren ($\blacktriangle$) bei 37°C inkubiert (jeweils ein typisches Experiment).

polycyclischen 2AAF bildeten in Rindererythrozyten-Suspensionen innerhalb von 4 h kein HbFe^{3+} .

Diese Ergebnis steht in Einklang mit der Lehrmeinung (Kiese, 1974), daß N-Arylacetamide N-deacetyliert und dann N- bzw. Ringhydroxyliert werden müssen, um zu aktiven HbFe^{3+} -bildenden Verbindungen zu werden, was eine zweifache metabolische Aktivierung in den Erythrozyten bedeuten würde. In Erythrozytensuspensionen *in vitro* wird offenbar weder 4ClAA noch 2AAF deacetyliert. Deshalb wurde auf weitere Versuche mit dieser Verbindungsklasse verzichtet.

2.9. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylacetohydroxamsäuren

N-Arylacetamide werden *in vivo* unter anderem am Amid-Stickstoff hydroxyliert (Cramer et al., 1960), wobei N-Arylacetohydroxamsäuren entstehen. Die Ferrihämoglobin-bildenden Eigenschaften dieser Verbindungsklasse wurden in Erythrozyten-Suspensionen *in vitro* untersucht.

Im Gegensatz zu der sehr geringen HbFe^{3+} -bildenden Aktivität der N-Arylacetamide erwiesen sich die N-Arylacetohydroxamsäuren in Erythrozyten-Suspensionen *in vitro* als stark wirksame HbFe^{3+} -Bildner. Sie waren allerdings schwächer wirksam als die entsprechenden N-deacetylierten Derivate, die Arylhydroxylamine.

Die aktivste der untersuchten N-Arylacetohydroxamsäuren war wieder die 4-chlorsubstituierte Verbindung (Abb. 14). Setzte man einer Rindererythrozyten-Suspension (7.6 mM HbFe^{2+}) in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4 0.10 mM NOH-4ClAA zu, so fand man nach 5 h bei 37°C 71% HbFe^{3+} . Das entsprach 54 mol HbFe^{3+} pro mol NOH-4ClAA. 0.32 mM NOH-4ClAA oxidierte innerhalb von 4 h 94% des Hämoglobins.

0.48 mM NOH-3.4DClAA oxidierte in Erythrozyten (10 mM HbFe^{2+}) im gleichen Zeitraum 81% des Hämoglobins; das waren 17 mol HbFe^{3+} pro

mol NOH-3.4DClAA.

Eine Konzentration von 0.62 mM NOH-4EAA produzierte in 4 h 72% HbFe^{3+} , das entsprach bei einer Konzentration von 9.9 mM HbFe^{2+} in der Erythrozytensuspension 16 Äquivalenten HbFe^{3+} pro mol NOH-4EAA.

Eine der untersuchten polycyclischen N-Arylaceto-hydroxamsäuren, NOH-4AABi, oxidierte in einer Konzentration von 0.54 mM innerhalb von 4 h 74% des Hämoglobins in Erythrozyten (10.4 mM HbFe^{2+}), das bedeutet 14 mol HbFe^{3+} pro mol NOH-4AABi.

NOH-2AAF war dagegen sehr viel schwächer wirksam. Erst eine Konzentration von 42 mM produzierte in 4 h 52% HbFe^{3+} in den Erythrozyten (10.4 mM HbFe^{2+}).

Die unsubstituierte Verbindung NOH-AA oxidierte in einer Konzentration von 0.32 mM innerhalb von 4 h 40% des Hämoglobins in Erythrozyten (9.3 mM HbFe^{2+}) und damit 12 mol HbFe^{3+} pro mol NOH-AA.

Die Ergebnisse zeigen, daß auch die N-Arylaceto-hydroxamsäuren in Erythrozytensuspensionen HbFe^{3+} -Bildner von unterschiedlicher Aktivität waren. Bis auf das besonders "reaktionsträge" NOH-2AAF haben alle untersuchten Verbindungen mehr als die stöchiometrische Menge Hämoglobin-Eisen oxidiert, ein Hinweis, daß auch N-Arylaceto-hydroxamsäuren die Oxidation von Hämoglobin katalysieren können. Ihre katalytische Aktivität war jedoch deutlich geringer als die der entsprechenden Arylhydroxylamine. Eine Ausnahme bildete NOH-4EAA, da es eine höhere katalytische Aktivität zeigte als das Arylhydroxylamin, was mit der geringen Stabilität von NOH-4EA in wässrigem Milieu bei 37°C bzw. der schnellen Reaktion von NO-4EB mit SH-haltigen Peptiden erklärt werden könnte.

Diese Ergebnisse erlauben den Schluß, daß nicht die N-Arylaceto-hydroxamsäuren als solche die Träger der katalytischen Aktivität sind, sondern erst nach enzymatischer N-Deacetylierung zu den entsprechenden Arylhydroxylaminen. Dann sollte das entstehende Arylhydroxylamin nach einem Reaktions-Cyclus durch die Glucose-utilisie-

renden Enzyme regeneriert werden und mehrmals mit Hämoglobin reagieren.

2.10. Einfluß von Glucose und Lactat auf die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Wenn NOH-4ClAA nicht als N-Arylacetohydroxamsäure selbst, sondern erst nach enzymatischer N-Deacetylierung den roten Blutfarbstoff oxidiert, dann sollte ein Zusatz von Glucose die Ferrihämoglobin-Bildung beschleunigen, da das bei der gekoppelten Oxidation von Hämoglobin und NOH-4ClA gebildete NO-4ClB durch NADPH-abhängige Reduktasen des Erythrozyten reaktiviert wird und so erneut reagieren kann.

2.10.1. N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Rindererythrozyten-Suspensionen

In Suspensionen von Rindererythrozyten (9 mM HbFe²⁺) mit 0.30 mM NOH-4ClAA wurden innerhalb von 3 h in Gegenwart von 11 mM Glucose 92% des Hämoglobins oxidiert, in Gegenwart von 18 mM Lactat 82% und in Erythrozyten-Suspensionen ohne Zusatz 81% (Abb. 15). Das entsprach etwa 25 Äquivalenten oxidiertem HbFe pro mol Hydroxamsäure nach 3 h, und zwar unabhängig von Glucose oder Lactat.

Dieses Ergebnis zeigt, daß ein Zusatz von Glucose keine Steigerung der katalytischen Aktivität von NOH-4ClAA bewirkt hat. Es ist daher auszuschließen, daß das Arylhydroxylamin NOH-4ClA das aktive HbFe³⁺-bildende Molekül ist.

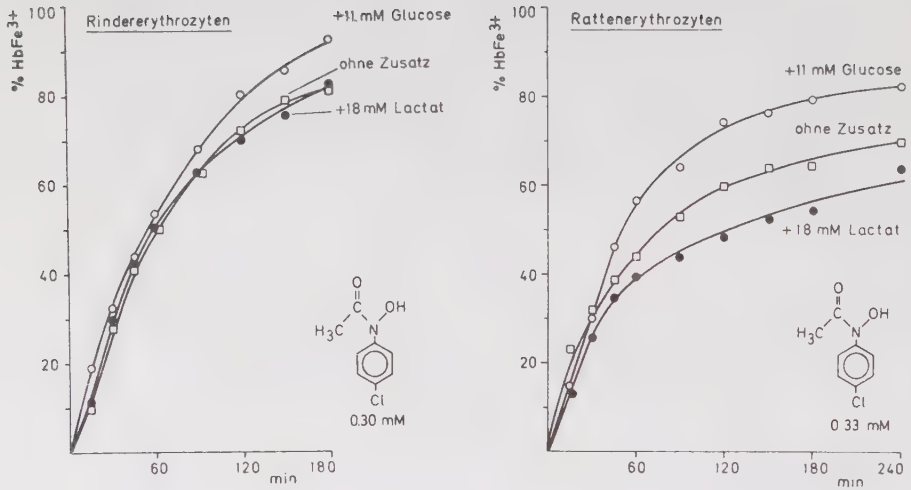


Abb. 15 Einfluß von Glucose und Lactat auf die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Erythrozyten

N-Hydroxy-4-chloracetanilid wurde mit gewaschenen Erythrozyten, suspendiert in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4 ohne Zusätze (□) mit 11 mM Glucose (○) oder 18 mM Lactat (●), bei 37°C inkubiert.

Abb. links: Rindererythrozyten, 9 mM HbFe²⁺ (jeweils 2 Versuche)

Abb. rechts: Rattenerothrozyten, 8 mM HbFe²⁺ (jeweils 2 Versuche)

2.10.2: N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Rattener erythrozyten-Suspensionen

Die gleiche Konzentration von NOH-4ClAA (0.33 mM) produzierte in einer Suspension von Rattener erythrozyten (7.6 mM HbFe²⁺) innerhalb von 3 h in Gegenwart von 11 mM Glucose 79% HbFe³⁺, in Gegenwart von 18 mM Lactat nur 54% HbFe³⁺ und ohne Zusatz 64% HbFe³⁺ (Abb. 15). Während in Erythrozytensuspensionen ohne Zusätze innerhalb von 3 h 15 mol HbFe³⁺ pro mol Hydroxamsäure gebildet wurden, fand man in Gegenwart von Glucose 18 mol und in Gegenwart von Lactat nur 13 mol HbFe³⁺ pro mol NOH-4ClAA.

Die Versuche mit Rinder erythrozyten haben gezeigt, daß die katalytische Aktivität des Arylhydroxylamins NOH-4ClA durch Glucose gesteigert wurde. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in den Versuchen mit Rattener erythrozyten erhalten. Auch in Suspensionen von Rattener erythrozyten reagierte NOH-4ClA in Gegenwart von Glucose schneller als in Gegenwart von Lactat oder in Suspensionen ohne Zusatz, doch war der Unterschied bei den Versuchen mit Rinder erythrozyten größer.

Insgesamt wurde die katalytische Aktivität der N-Arylaceto-hydroxamsäure NOH-4ClAA in Suspensionen von Rattener erythrozyten durch Glucose nur wenig gesteigert, während sie in Versuchen mit Rinder erythrozyten von der Anwesenheit von Glucose unbeeinflusst blieb. Die geringe Steigerung in Rattener erythrozyten könnte ein Hinweis sein, daß geringe Mengen NO-4ClB an der HbFe³⁺-Bildung beteiligt sind.

2.11. Reaktionsprodukte von N-Arylaceto-hydroxamsäuren

2.11.1. Verschiedene N-Arylaceto-hydroxamsäuren in Rinder erythrozyten-Suspensionen

Jeweils 0.55 mM NOH-4ClAA, NOH-4EAA, NOH-4AABi und NOH-2AAF wur-

den in Rindererythrozyten, suspendiert in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer pH 7.4 (9-10 mM HbFe²⁺), bei 37°C inkubiert. Nach 30, 60 und 120 min wurden aliquote Teile mit Ether extrahiert, nicht umgesetzte Hydroxamsäure mit 2 N NaOH abgetrennt und mit Hilfe der DC gereinigt. Die in der etherischen Phase zurückbleibenden neutralen und sauren Produkte wurden ebenfalls mithilfe der DC getrennt.

Neben den eingesetzten N-Arylacetoxyhydroxamsäuren konnten in allen Versuchen die formalen Reduktionsprodukte, die N-Arylacetamide 4ClAA, 4EAA, 4AABi bzw. 2AAF nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde nach Reaktion von NOH-4EAA in Rindererythrozyten-Suspensionen NO-4EB und nach Reaktion von NOH-2AAF Bisazoxyfluoren gefunden. Zusatz von 11 mM Glucose oder 18 mM Laktat hatte keinen Einfluß auf die Produkt-Konzentrationen.

Mit der dünnschichtchromatographischen Trennung und dem UV-spektroskopischen Nachweis der Produkte wurden kleine Konzentrationen flüchtiger Verbindungen (z.B. Nitrosoarene) nicht erfaßt. Die folgenden Versuche zur Ermittlung von Metaboliten der N-Arylacetoxyhydroxamsäuren in Rindererythrozyten-Suspensionen wurden deshalb mit einer verbesserten Aufarbeitungsmethode durchgeführt.

2.11.2. N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Rindererythrozyten-Suspensionen

Nach Inkubationszeiten von 2, 30 und 60 min wurde in Rindererythrozyten-Suspensionen (10 mM HbFe²⁺) mit 1.1 mM NOH-4ClAA die Hb-Fe³⁺-Konzentration bestimmt und in den Etherextrakten der Hämolyse die Konzentrationen von Ausgangsmaterial und Umsetzungsprodukten gemessen.

Nicht umgesetztes Substrat NOH-4ClAA wurde nach 2 min zu 93%, nach 30 min zu 79% und nach 67 min zu 74% zurückgewonnen. Die Konzentration von HbFe³⁺ betrug nach 2 min 4%, nach 30 min 57% und

Tabelle 5 Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Erythrozytensuspensionen vom Rind

t (min)	2		30		67		
	a)	a)	b)	c)	a)	b)	c)
HbFe ³⁺ (%)	3.6	57.1	58.8	62.7	87.3	83.3	84.6
NOH-4ClAA (μM)	934.3	769.7	813.8	801.2	630.0	819.0	753.9
(%)	(92.5)	(73.3)	(77.5)	(76.3)	(60.0)	(78.0)	(71.8)
4ClAA (μM)	0.5	12.6	13.7	12.6	24.2	21.0	23.1
(%)	(0.1)	(1.2)	(1.3)	(1.2)	(2.3)	(2.0)	(2.2)
NO-4ClB (μM)	0.1	5.3	8.4	7.4	5.3	8.4	9.5
(%)	(0.1)	(0.5)	(0.8)	(0.7)	(0.5)	(0.8)	(0.9)
NO ₂ -4ClB (μM)	0.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
(%)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)
4ClA (μM)	0.3	1.1	2.1	2.1	4.2	3.2	4.2
(%)	(0.1)	(0.1)	(0.2)	(0.2)	(0.4)	(0.3)	(0.4)

Gewaschene Rindererythrozyten (10 mM HbFe²⁺) in Krebs-Ringer-Phosphat-puffer pH 7.4

a) mit 11 mM Glucose

b) nach 16 h Vorinkubation bei 37°C, ohne Glucose

c) nach 16 h Vorinkubation bei 37°C, mit Glucose

wurden mit 1.05 mM N-Hydroxy-4-chloracetanilid bei 37°C inkubiert (jeweils ein typisches Experiment).

nach 67 min 83%. Daneben wurde das formale Reduktionsprodukt 4ClAA und in kleinen Konzentrationen 4ClA, NO-4ClB und NO₂-4ClB gefunden (Tab. 5).

Ebenso wie die Kinetik der HbFe³⁺-Bildung wurde auch das Produktmuster durch die Anwesenheit von 11 mM Glucose nicht beeinflusst. Um den Einfluß der im Erythrozyten gespeicherten Glucose kennenzulernen, wurden die Versuche mit Erythrozyten durchgeführt, die durch eine 16stündige Inkubation bei 37°C ohne Glucose-Zusatz an endogenen Stoffen, wie z.B. Glucose, verarmt waren. Wie Tab. 5 zeigt, waren die Konzentrationen der Produkte nicht wesentlich verändert, d.h. endogene Stoffe haben demnach keinen Einfluß auf das Produktmuster.

2.11.3. N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Rattenerythrozyten-Suspensionen

In Versuchen mit Rattenerythrozyten-Suspensionen (6.5 mM HbFe²⁺) und 1.0 mM NOH-4ClAA wurden nach 2 min 1%, nach 30 min 49% und nach 67 min 69% HbFe³⁺ bestimmt. Nach 2 min wurden 78% NOH-4ClAA, nach 30 min 81% und nach 67 min 74% wiedergefunden. Die Konzentration des Ausgangsmaterials war so hoch wie bei den Versuchen mit Rindererythrozyten, die HbFe³⁺-Konzentration dagegen niedriger, das Produktmuster zeigte ebenfalls keine Unterschiede (Tab. 6).

2.11.4. N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren in Rindererythrozyten-Suspensionen

1.1 mM NOH-2AAF oxidierte in einer Suspension von Rindererythrozyten (8.9 mM HbFe²⁺) innerhalb von 30 min 15% und innerhalb von 67 min 28% des Hämoglobins, also viel weniger als die gleiche Konzentration von NOH-4ClAA. Auch bei diesen Experimenten wurde die

Tabelle 6 Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-4-chloracetanilid
in Erythrozytensuspensionen von der Ratte

t (min)	2	30	67
HbFe ³⁺ (%)	0	49.3	66.5
NOH-4ClAA (μM)	790.8	819.1	873.4
(%)	(78.3)	(81.1)	(86.5)
4ClAA (μM)	1.0	5.1	15.2
(%)	(0.1)	(0.5)	(1.5)
NO-4ClB (μM)	2.0	10.1	8.1
(%)	(0.2)	(1.0)	(0.8)
NO ₂ -4ClB (μM)	0.3	3.0	3.0
(%)	(0.1)	(0.3)	(0.3)
4ClA (μM)	1.0	2.0	3.0
(%)	(0.1)	(0.2)	(0.3)

Gewaschene Rattenerythozyten (6.5 mM HbFe²⁺, in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) wurden mit 1.05 mM N-Hydroxy-4-chloracetanilid bei 37°C inkubiert (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

Tabelle 7 Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren
in Erythrozytensuspensionen vom Rind

t (min)	30			67		
	a)	b)	c)	a)	b)	c)
HbFe ³⁺ (%)	12.3	16.2	15.5	24.0	30.4	29.5
NOH-2AAF (μM)	887.1	847.7	800.4	850.7	881.7	873.1
(%)	(85.3)	(82.3)	(74.8)	(81.8)	(85.6)	(81.6)
2AAF (μM)	0.8	1.0	1.4	1.0	2.9	2.6
(%)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.3)	(0.2)
NO/NO ₂ -2F (μM)	0.8	0.5	0.2	0.5	0.4	0.2
(%)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)
2AF (μM)	0.4	0.3	0.6	0.8	1.3	1.1
(%)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)	(0.1)

Gewaschene Rindererythrozyten, 8.9 mM HbFe²⁺, in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4

a) mit 11 mM Glucose

b) nach 16 h Vorinkubation bei 37°C, ohne Glucose

c) nach 16 h Vorinkubation bei 37°C, mit Glucose

wurden mit 1.05 mM N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren bei 37°C inkubiert (jeweils ein typisches Experiment).

[illegible]

Die große Frage der Konstruktivistischen -epistemologischen Debatte ist, ob es sich um eine Frage der Methode oder der Erkenntnistheorie handelt. Es geht darum, ob es sich um eine Frage der Methode handelt, die durch die Wahl der richtigen Methode gelöst werden kann, oder ob es sich um eine Frage der Erkenntnistheorie handelt, die durch die Wahl der richtigen Methode gelöst werden kann. Im ersten Fall ist die Methode das Mittel zum Zweck, im zweiten Fall ist die Methode das Ziel selbst. Die Frage, ob es sich um eine Frage der Methode oder der Erkenntnistheorie handelt, ist eine Frage der Erkenntnistheorie, die durch die Wahl der richtigen Methode gelöst werden kann.

[illegible][illegible][illegible]

Wenn die Aktivierung von N-Arylacetoxyhydroxamsäuren tatsächlich in einer enzymatischen N-Deacetylierung besteht, dann sollte in Gegenwart von Paraaxon auch die NOH-4ClAA-induzierte HbFe^{3+} -Bildung und die Bildung von Arylamin gehemmt werden, denn ein Zusatz von Paraaxon hemmt die Aktivität der erythrozytären Acetylcholinesterase in vitro.

2.12.1. Ferrihämoglobin-Bildung

Die Wirkung verschiedener Paraaxon-Konzentrationen (10^{-8} - 10^{-2} M) auf die Aktivität der Acetylcholinesterase und auf die Kinetik der HbFe^{3+} -Bildung durch NOH-4ClAA wurde in Rindererythrozyten-Suspensionen untersucht.

In einer Rindererythrozyten-Suspension (10 mM HbFe^{2+}) mit $73 \mu\text{M}$ NOH-4ClAA wurde ohne Paraaxon zwar der gleiche Verlauf der HbFe^{3+} -Bildung beobachtet wie in Gegenwart von 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} oder 10^{-2} M Paraaxon, aber die Aktivität der Acetylcholinesterase war schon bei Anwesenheit von 10^{-8} M Paraaxon auf 89%, und bei 10^{-6} M Paraaxon auf etwa 30% Restaktivität gesunken (Abb. 16). Diese 30% Restaktivität der Erythrozyten bezüglich der Spaltung von S-Acetylthiocholinjodid wurde in Abwesenheit von NOH-4ClAA auch in Gegenwart höchster Paraaxon-Konzentrationen beobachtet, ein Hinweis, daß ein Teil der Esteraseaktivität im Erythrozyten durch Paraaxon nicht zu blockieren war.

In Rindererythrozyten-Suspensionen mit höheren Hydroxamsäure-Konzentrationen von 0.27 mM NOH-4ClAA wurden in Gegenwart von 10^{-7} M Paraaxon die gleichen HbFe^{3+} -Konzentrationen gefunden wie ohne Esterasehemmer (nach 2 h 71% HbFe^{3+}). In Anwesenheit von 10^{-5} M oder 10^{-3} M Paraaxon wurden etwas niedrigere HbFe^{3+} -Konzentrationen gefunden (68% bzw. 61%), was in Anbetracht der hohen Paraaxon-Konzentration nicht nur durch die Blockade der Esterasen, sondern auch durch unspezifische Reaktionen mit anderen Enzymen des Erythrozyten bedingt sein kann.

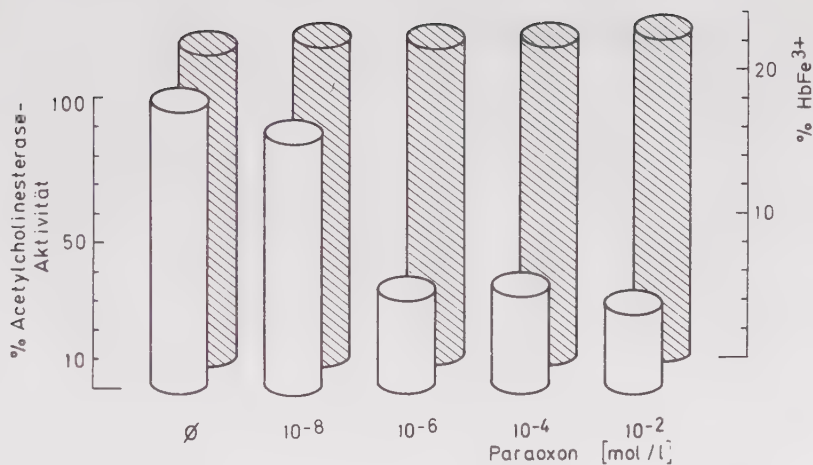


Abb. 16 Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid und Acetylcholinesterase-Aktivität in Erythrozytensuspensionen in Abhängigkeit von der Paraaxon-Konzentration

Gewaschene Rindererythrozyten (10 mM HbFe²⁺, in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) wurden mit 73 µM N-Hydroxy-4-chloracetanilid und verschiedenen Paraaxon-Konzentrationen bei 37°C inkubiert (Mittelwerte aus jeweils 3 Versuchen).

schraffierte Säulen: Ferrihämoglobin-Konzentration
 leere Säulen: Acetylcholinesterase-Aktivität

Versuche mit 1.6 mM NOH-3,4DCLAA und dem Estrase-Inhibitor TOTP in Suspensionen von Rindererythrozyten führten zum gleichen Ergebnis. Erst bei sehr hohen TOTP-Konzentrationen (17 mM) wurden etwas niedrigere HbFe^{3+} -Konzentrationen bestimmt.

2.12.2. 4-Chloranilin-Bildung

In Rindererythrozyten-Suspensionen (7.5 mM HbFe^{2+}) mit 0.5 mM NOH-4CLAA wurde parallel zur HbFe^{3+} -Bildung die Bildung von 4CLA verfolgt. Wie Abb. 17 zeigt, wurde die Kinetik der HbFe^{3+} -Bildung durch die Anwesenheit von 1 mM Paraaxon nicht beeinflusst, während die Bildung von 4CLA aus NOH-4CLAA in Gegenwart des Esterase-Inhibitors gehemmt wurde. Ohne Zusatz von Paraaxon wurden nach 3 h 2.1% der Hydroxamsäure als 4CLA gefunden (11 nmol/ml), in Gegenwart von 1 mM Paraaxon 0.7% (3 nmol/ml), also nur ein Drittel dieser Menge.

In Suspensionen von Rindererythrozyten mit 0.1 mM NOH-4CLAA betrug die Konzentration von 4CLA nach 3 h 2 nmol/ml (ebenfalls 2.1%) in Gegenwart von 1 mM Paraaxon dagegen nur 0.6 nmol/ml (0.6%). Die Kinetik der HbFe^{3+} -Bildung blieb wieder unbeeinflusst von 1 mM Paraaxon.

In Kontrollversuchen mit Paraaxon in Suspensionen von Rindererythrozyten wurde keine erhöhte Autoxidation des Hämoglobins gefunden. Auch die Diazotierungs- und Kupplungsreaktion wurde durch Paraaxon nicht gestört.

1 mM Paraaxon konnte also zwar die 4CLA-Bildung aus NOH-4CLAA, nicht aber die HbFe^{3+} -Bildung durch NOH-4CLAA hemmen. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß die enzymatische N-Deacetylierung keine Rolle für die HbFe^{3+} -Bildung durch N-Arylacetohydroxamsäuren spielt. Die Bildung von Arylamin aus Arylhydroxylamin ist für die HbFe^{3+} -Bildung nicht wesentlich, sondern eher als eine Inaktivierung zu betrachten.

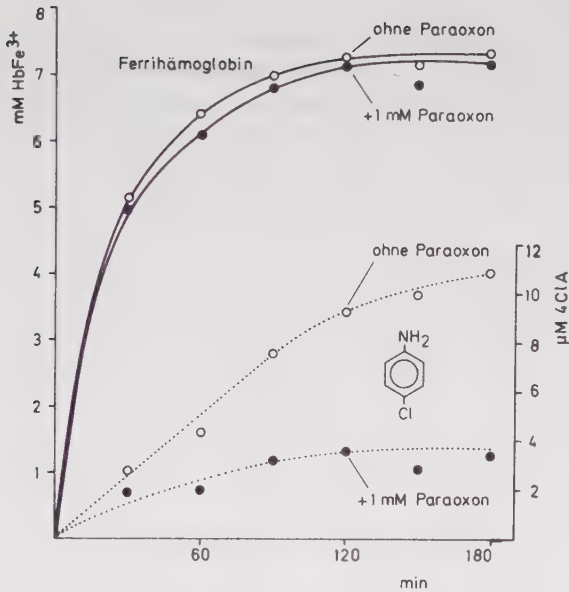


Abb. 17 Einfluß von Paraoxon auf die Ferrihämoglobin- und 4-Chloranilin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Erythrozytensuspensionen vom Rind

Gewaschene Rindererythrozyten (7.5 mM HbFe²⁺, in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7.4, mit 11 mM Glucose) wurden mit 0.5 mM N-Hydroxy-4-chloracetanilid ohne Paraoxon (○) oder mit 1 mM Paraoxon (●) bei 37°C inkubiert.

durchgezogene Kurven: Ferrihämoglobin-Konzentration

durchbrochene Kurven: 4-Chloranilin-Konzentration

Die Symbole sind Mittel aus jeweils 2 Experimenten.

2.13. Anaerobe Reaktion der N-Arylacetoxyhydroxamsäuren
in Erythrozytensuspensionen

In zwei parallelen Versuchen mit Suspensionen von Rindererythrozyten und 0.5 mM NOH-3.4DCIAA wurden die HbFe^{3+} -Konzentrationen bestimmt. Ein Versuch wurde anaerob, der zweite aerob durchgeführt. Unter Zutritt von Luftsauerstoff wurden innerhalb von 4 h 90% des Hämoglobins oxidiert, unter Stickstoff nur 2%. Nach Entfernen des Stickstoff-Stroms setzte die HbFe^{3+} -Bildung sofort ein.

Sauerstoff ist daher für die Reaktion der N-Arylacetoxyhydroxamsäuren mit Hämoglobin in Erythrozyten in vitro essentiell.

3. In-vitro-Versuche mit gereinigtem Human-Hämoglobin

Die Ferrihämoglobin-Bildung in Lösungen von gereinigtem Hämoglobin in vitro wurde untersucht, um den Einfluß der erythrozytären Enzyme auf die Bildung der aktiven Molekülspezies auszuschließen und damit zu prüfen, ob Hämoglobin selbst zur Aktivierung aromatischer Amine und ihrer Derivate fähig ist. Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden mit isoliertem Human-Hämoglobin ausgeführt, da es zu 95% aus Hämoglobin A besteht, im Gegensatz zu Ratten-Hämoglobin, das eine Mischung aus sechs relativ gleich verteilten Hämoglobinkomponenten ist. Gereinigtes Human-Hämoglobin kann ohne Komplikationen hergestellt und einige Zeit aufbewahrt werden, während Ratten-Hämoglobin nur schwierig gereinigt, gehandhabt und aufbewahrt werden kann (P.Eyer, unveröffentlicht; S.Stein et al., 1971; L.M.Garrick et al., 1975).

3.1. Ferrihämoglobin-Bildung durch Anilin und 4-Chloranilin

11.4 mM 4CLA produzierte HbFe^{3+} in einer Hämoglobin-Lösung (2.7mM HbFe^{2+}) bei 37°C, und zwar ungefähr doppelt so schnell, verglichen mit der Autoxidation der Hb-Lösung unter den gegebenen Versuchsbedingungen.

Setzte man nur 2.7 mM 4CLA (äquimolare Konzentration) zu, so war die Anfangsgeschwindigkeit der HbFe^{3+} -Bildung kaum größer als die der Autoxidation, nahm aber nach 30 min zu und war nach 4 h so groß wie im Versuch mit der vierfachen 4CLA-Konzentration. Die Kinetik der HbFe^{3+} -Bildung war sigmoid, Indikation für einen autokatalytischen Prozeß.

Bei Versuchen mit einer 1.06 mM Hb-Lösung und 5.03 mM 4CLA oder 5.17 mM AN wurde ebenfalls doppelt so schnell HbFe^{3+} gebildet wie durch die Autoxidation des Hämoglobins (Abb. 18). Zusatz von 1 mM NADPH beschleunigte sowohl die Autoxidation des Hämoglobins als

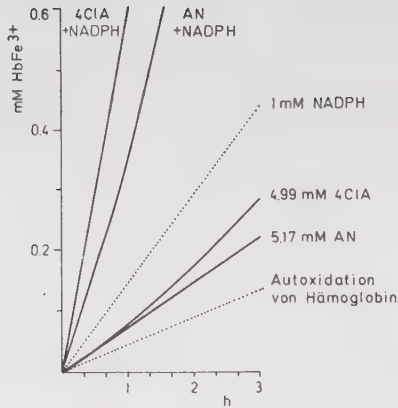


Abb. 18 Ferrihämoglobin-Bildung durch Anilin und 4-Chloranilin in Hämoglobinlösung

Die Ferrihämoglobin-Bildung durch Anilin und 4-Chloranilin wurde anhand der Extinktionszunahme bei 630 nm in einer Hämoglobinlösung (1.06 mM HbFe^{2+} , in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4) mit und ohne Zusatz von 1 mM NADPH bei 37°C verfolgt (jeweils ein typisches Experiment).

Die durchbrochenen Kurven zeigen die autoxidationsbedingte Ferrihämoglobin-Bildung mit und ohne Zusatz von NADPH.

auch die 4ClA- und die AN- induzierte HbFe^{3+} - Bildung:

	<u>ohne NADPH</u>	<u>+ 1 mM NADPH</u>
5.17 mM AN	21 nM $\text{HbFe}^{3+}/\text{sec}$	117 nM $\text{HbFe}^{3+}/\text{sec}$
5.03 mM 4ClA	25 nM $\text{HbFe}^{3+}/\text{sec}$	187 nM $\text{HbFe}^{3+}/\text{sec}$
Autoxidation	14 nM $\text{HbFe}^{3+}/\text{sec}$	41 nM $\text{HbFe}^{3+}/\text{sec}$

(Mittelwert aus 3 Versuchen)

Während die HbFe^{3+} -Bildung durch AN und 4ClA ohne Zusatz von 1 mM NADPH etwa gleich schnell verlief, wurde nach Zugabe von NADPH eine Erhöhung der Geschwindigkeit der Hb-Oxidation durch AN um das sechsfache und der durch 4ClA sogar um das achtfache beobachtet.

Diese Versuche haben wahrscheinlich gemacht, daß aromatische Amine nicht nur durch Oxyhämoglobin im Erythrozyten, sondern auch durch isoliertes Oxyhämoglobin selbst zu Ferrihämoglobin-bildenden Spezies aktiviert werden.

3.2. Reaktionen von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Hämoglobin

Um den Mechanismus der Hämoglobin-Oxidation durch N-Arylacetoxyhydroxamsäuren aufzuklären, wurden die Charakteristika der Arylhydroxylamin-induzierten Hämoglobin-Oxidation in vitro mit denen der N-Arylacetoxyhydroxamsäure-induzierten verglichen. Die Versuche wurden mit dem Arylhydroxylamin N-Hydroxy-4-chloranilin und mit der N-Arylacetoxyhydroxamsäure N-Hydroxy-4-chloracetanilid durchgeführt.

3.2.1. Spektroskopische Befunde

Eine Lösung gereinigten Oxyhämoglobins in 0.2 M Phosphatpuffer

pH 7.4 zeigte Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich bei 576 (α), 540 (β) und 413 nm (Soret-Bande). Durch Oxidation zu Ferrihämoglobin bildete sich ein Maximum bei 630 nm, und die Soret-Bande lag bei 404 nm. Nach Zugabe einer äquimolaren Konzentration von NOH-4ClA zu einer 0.11 mM HbO_2 -Lösung war sofort das Spektrum des HbFe^{3+} zu sehen (Abb. 19). Wurden wiederholt kleinere Konzentrationen NOH-4ClA zugesetzt, so konnte eine stufenweise Extinktionszunahme bei 630 nm beobachtet werden.

Wurde dagegen zu einer Desoxyhämoglobin-Lösung (0.11 mM HbFe^{2+}) unter Ausschluß von Luftsauerstoff in einer Thunberg-Küvette 0.12 oder 0.23 mM NOH-4ClA gegeben, so wurde keine Verschiebung der Absorptionsmaxima bei 553 und 428 nm beobachtet, und ebenso war bei 630 nm keine Extinktionszunahme durch HbFe^{3+} -Bildung zu sehen.

Bei Zugabe einer 0.11 oder 0.22 mM NO-4ClB-Lösung zu einer HbO_2 - oder DesoxyHb-Lösung bildete sich dagegen sofort das Adduktspektrum des Nitrosoaren - Hämoglobin - Komplexes. Die Maxima von HbO_2 oder DesoxyHb verschwanden, und es bildeten sich die neuen Banden des HbFe^{2+} -NO-4ClB - Adduktes bei 561, 540 und 420 nm (Abb. 19).

NOH-4ClA reagierte also nur in Gegenwart von Sauerstoff mit Hämoglobin in einer gekoppelten Oxidation. NO-4ClB, das Oxidationsprodukt von NOH-4ClA, reagierte dagegen auch unter Ausschluß von Sauerstoff mit dem zweiwertigen Eisen im Hämoglobin-Molekül unter Bildung des Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplexes (Jung, 1940; Scheler, 1960). Nur NO-4ClB ist also zur Addukt-Bildung befähigt.

3.2.2. Sauerstoff als dritter Reaktionspartner

Als die Änderung der O_2 -Konzentration in einer Reaktionsmischung von HbO_2 (0.5 mM HbFe^{2+}) und 1.4 bzw. 2.8 mM NOH-4ClA mithilfe einer O_2 -Elektrode (Clark-Typ) verfolgt wurde, wurde ein rascher Verbrauch von Sauerstoff beobachtet, eine vorangehende Freisetzung von

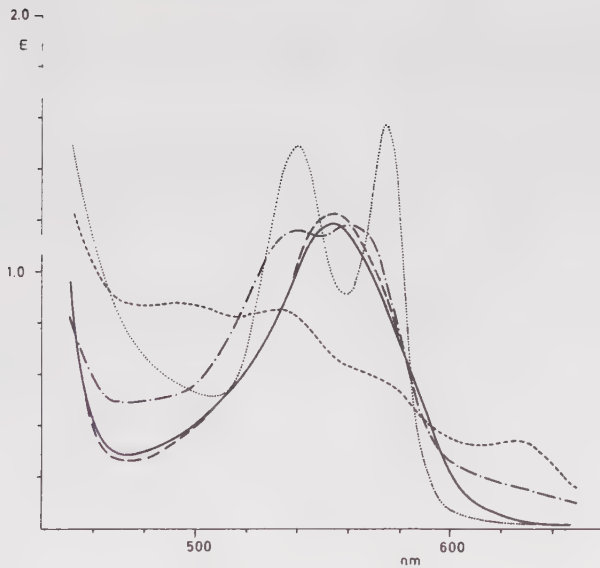


Abb. 19 Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich
(gereinigtes Human-Hämoglobin)

- Oxyhämoglobin (0.11 mM HbFe²⁺ in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4)
- Desoxyhämoglobin
- · - · - · - Oxyhämoglobin + 0.11 mM N-Hydroxy-4-chloranilin
- Desoxyhämoglobin + 0.11 mM N-Hydroxy-4-chloranilin
- - - - - Oxy-/Desoxyhämoglobin + 0.11 mM Nitroso-4-chlorbenzol

O₂ aus der Bindung an Hämoglobin wurde nicht beobachtet. Bei der sehr schnellen Reaktion von NOH-4ClA mit Hämoglobin erfolgte die Freisetzung von O₂ so rasch, daß sie durch die Trägheit der Elektrode nicht erfaßt wird. So wird verständlich, daß nur der Verbrauch von O₂ aus der Lösung für die Oxidation des Hämoglobins und des Substrats gemessen wurde.

3.3. Kinetik der Hämoglobin-Oxidation durch N-Hydroxy-4-chloranilin

Da die Reaktion von NOH-4ClA mit gereinigtem Human-Hämoglobin in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 bei 37°C sehr schnell ist, wurde ihre Kinetik mit Hilfe einer Stopped-Flow-Apparatur untersucht (Extinktionszunahme bei 630 nm gegen 680 nm).

Die Geschwindigkeit der Ferrihämoglobin-Bildung wurde in Abhängigkeit von der Hämoglobin-Konzentration (0.054 - 0.215 mM HbFe²⁺) und der NOH-4ClA-Konzentration (0.055-0.429 mM) gemessen (Abb. 20). Dabei wurde eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von den Konzentrationen beider Reaktionspartner gefunden und daraus auf eine Reaktion 2.Ordnung geschlossen. Aus den Ergebnissen wurde eine Geschwindigkeitskonstante von

$$k = 7840 \pm 300 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$$

berechnet (Mittelwert aus 6 Versuchen $\pm$ S.E.).

3.4. Bestimmung der Aktivierungsenergie der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Hämoglobin

Wurde die Geschwindigkeit der Hämoglobin-Oxidation durch 0.107 mM NOH-4ClA in einer 0.107 mM HbFe²⁺-Lösung bei verschiedenen Tempera-

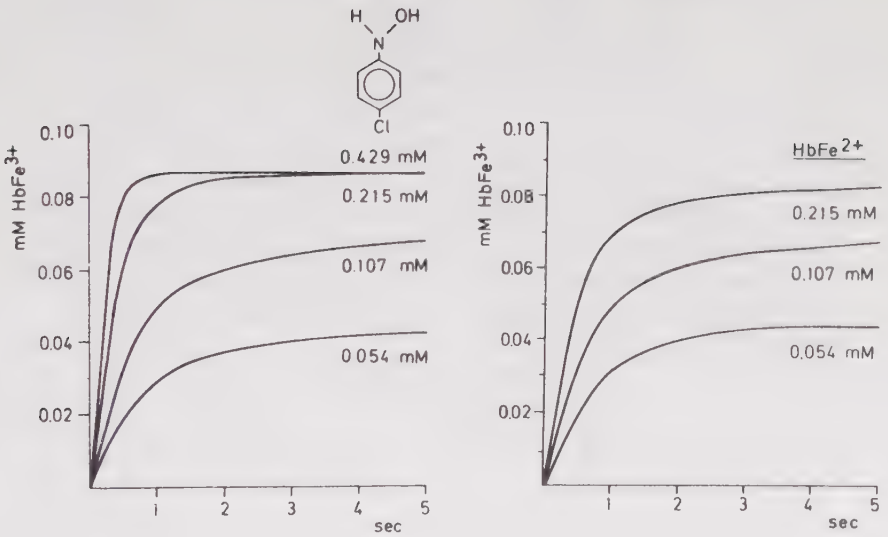


Abb. 20 Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin in Hämoglobinlösung

Die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin wurde anhand der Extinktionszunahme bei 630 nm in Lösungen von gereinigtem Human-Hämoglobin in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 bei 37°C verfolgt.

Abb. links: verschiedene NOH-4ClA-Konzentrationen
0.107 mM HbFe²⁺

Abb. rechts: 0.107 mM NOH-4ClA
verschiedene HbFe²⁺-Konzentrationen

turen gemessen, so ergab sich im Bereich zwischen 17 und 37°C nur eine geringe Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Temperatur:

<u>Temperatur</u> (°C)	<u>k</u> (l·mol ⁻¹ ·sec ⁻¹)
17	5100
24	5900
31	6930
37	7840

Bei einer Temperaturerhöhung von 17°C auf 37°C nahm der Wert für die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion nur um die Hälfte zu. Als nach Arrhenius $\log k$ gegen $1/T$ aufgetragen wurde, konnte aus der Steigung der resultierenden Geraden eine Aktivierungsenergie von

$$E_a = 3.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

ermittelt werden (Abb. 21).

3.5. Bestimmung der katalytischen Aktivität von N-Hydroxy-4-chloranilin

Die Konzentration des Hämoglobins und von NOH-4ClA war bei diesen Experimenten zu Ermittlung der katalytischen Aktivität ungefähr 30-mal so hoch wie bei den spektroskopischen Versuchen (s. 3.2.-3.4.). Das bot den Vorteil, daß auch relativ langsame Reaktionen, wie z.B. die von kleinen Konzentrationen NOH-4ClAA mit Hb (s. 3.11.), gemessen werden konnten.

Um zu prüfen, wieviel Äquivalente Eisen pro mol Arylhydroxylamin oxidiert werden, wurden Versuche mit verschiedenen NOH-4ClA-Konzentrationen durchgeführt. Als zu einer Lösung von gereinigtem Human-Hämoglobin (2.7 mM HbFe²⁺) in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 bei 37°C

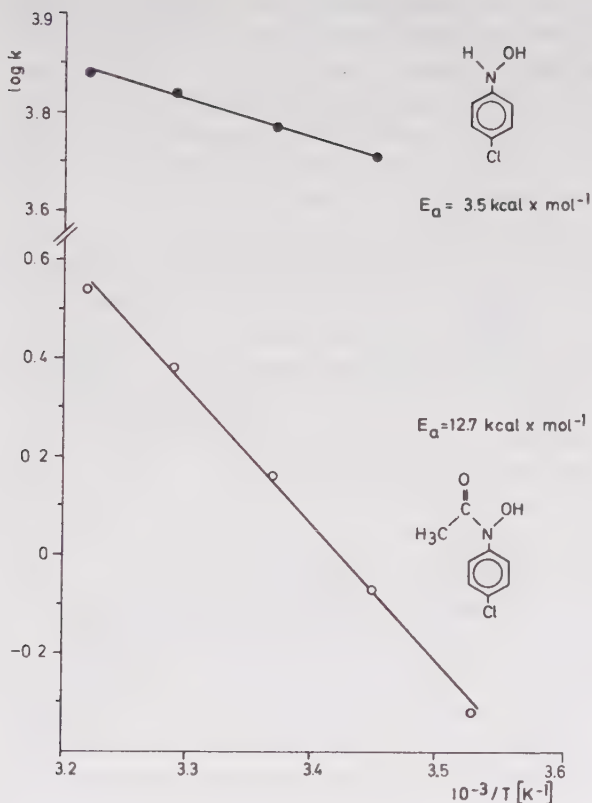


Abb. 21 Bestimmung der Aktivierungsenergie der Reaktionen von N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chloroacetanilid mit Hämoglobin

0.107 mM N-Hydroxy-4-chloranilin (●) bzw. 0.113 mM N-Hydroxy-4-chloroacetanilid (○) wurden mit gereinigtem Human-Hämoglobin (0.107 mM HbFe, in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4) bei verschiedenen Temperaturen (10–37°C) inkubiert (jeweils 2 Experimente).

eine äquimolare Menge NOH-4ClA gegeben wurde, bildete sich sofort weniger als die stöchiometrische Menge HbFe^{3+} (0.7 Äquivalente). Bei niedrigeren NOH-4ClA-Konzentrationen (0.106, 0.673, 1.35 mM) wurde durch die schnelle Anfangsreaktion sofort 1 Äquivalent HbFe^{3+} gebildet. Anschließend wurde im viel langsameren Teil der biphasischen Kinetik noch weiteres HbFe^{3+} gebildet (Abb. 22), so daß bis zu 3 Äquivalente Eisen oxidiert wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß NOH-4ClA schnell mit Hämoglobin reagierte, wobei ein Äquivalent HbFe^{2+} oxidiert wurde. Eine katalytische Aktivität von NOH-4ClA wurde nicht beobachtet, weil eine metabolische Regenerierung von NOH-4ClA in Lösungen von gereinigtem Hämoglobin nicht möglich ist. Die Ursache der sich anschließenden langsamen HbFe^{3+} -Bildung wird durch Reaktion von entstehendem NO-4ClB mit überschüssigem HbFe^{2+} erklärt (s. 3.7).

3.6. Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-4-chloranilin

Äquimolare Mengen NOH-4ClA produzierten in einer Hämoglobin-Lösung (6 mM HbFe^{2+}) innerhalb von 1 min 54% HbFe^{3+} . In den Etherextrakten der Reaktionsmischung wurden per UV-Spektroskopie NO-4ClB, 4ClA und BAClB in Mengen von 38, 2 und 1% des eingesetzten Substrates bestimmt.

Gab man zu einer Hb-Lösung (3.3 mM HbFe^{2+}) 3.0 mM NOH-4ClA, so wurden nach 2 min bei 37°C 53% HbFe^{3+} gebildet. Die HPLC-Analyse der Etherextrakte gab folgendes Ergebnis:

745 μM NO-4ClB	(25.1%)
14 μM NO ₂ -4ClB	(0.5%)
15 μM 4ClA	(0.5%)

Kleine Konzentrationen von BAClB konnten durch diese Methode nicht

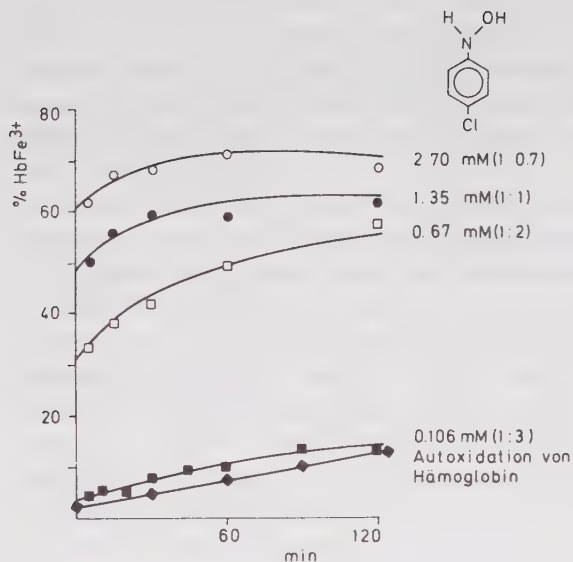


Abb. 22 Bestimmung der katalytischen Aktivität von N-Hydroxy-4-chloranilin in Hämoglobin-Lösung

Verschiedene Konzentrationen N-Hydroxy-4-chloranilin wurden mit gereinigtem Human-Hämoglobin (2.7 mM HbFe^{2+} , in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4) bei 37°C inkubiert. Die Zahlenwerte in Klammern geben das Verhältnis Arylhydroxylamin zu oxidiertem HbFe^{2+} wieder (jeweils ein typisches Experiment).

Die Ergebnisse wurden um die autooxidationsbedingte Ferrihämoglobin-Bildung (◆) korrigiert.

erfaßt werden, da BAC1B bei dem verwendeten Fließmittelgemisch (Methanol/Wasser 70:30) eine Retentionszeit von 15 min hatte und in den zu erwartenden Konzentrationen kein scharfes Signal im HPLC-Chromatogramm ergab.

Insgesamt wurden also nur 26.1% des eingesetzten Materials wiedergefunden. Ein großer Teil war vermutlich an die Globin-Fraktion gebunden und deshalb selbst nach Oxidation des HbFe^{2+} mit Kaliumferricyanid nicht mehr mit Ether extrahierbar (Kiese & Taeger, 1976).

Besondere Beachtung verdient der Befund, daß bei dieser gekoppelten Oxidation das Reduktionsprodukt 4ClA gefunden wurde. Schon Bamberger (1900) berichtete, daß bei der Autoxidation von NOH-4ClA 4ClA entsteht, auch ohne Beteiligung von reduzierenden Enzymen.

Setzte man statt des Arylhydroxylamins sein Oxidationsprodukt NO-4ClB in einer Konzentration von 3.0 mM der Hämoglobin-Lösung (3.3 mM HbFe^{2+}) zu, so wurden innerhalb von 2 min bei 37°C nur 8.5% HbFe^{3+} gebildet. Erst nach 60 min Inkubation waren 68.2% des Hämoglobins oxidiert. Mit Hilfe der HPLC fand man in den Etherextrakten

	nach 2 min	nach 60 min
NO-4ClB	912 μM (30.4%)	601 μM (20.0%)
$\text{NO}_2\text{-4ClB}$	14 μM (0.5%)	23 μM (0.8%)
4ClA	1 μM (0.1%)	15 μM (0.5%)

Insgesamt war also ähnlich wie bei dem Versuch mit NOH-4ClA die Massenbilanz negativ, da nur 30 bzw. 20% des eingesetzten NO-4ClB wiedergefunden wurden. Das ist Indikation, daß der größte Teil an anderer Stelle als am Fe^{2+} des Hämoglobins gebunden wird. Außerdem werden zwischen 2 und 60 min durch den Elektronenübergang von Hb-Fe^{2+} auf Sauerstoff und NO-4ClB Reaktionen in Gang gesetzt, wodurch einerseits die negative Massenbilanz um weitere 10% vergrößert, aber auch die Ausbeute an 4ClA erhöht wird.

3.7. Vergleich der Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin und Nitroso-4-chlorbenzol

Als zu einer Lösung von gereinigtem Desoxy-Hämoglobin (0.05 mM HbFe^{2+}) in einer Thunberg-Küvette 0.10 mM NO-4ClB gegeben wurde, bildete sich sofort der Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplex mit Absorptionsmaxima bei 540 und 561 nm (Abb. 19). Zugleich wurde ein Extinktionsanstieg bei 630 nm beobachtet, der ein Hinweis auf die Entstehung von HbFe^{3+} sein könnte. Durch Begasen mit Kohlenmonoxid konnte jedoch bewiesen werden, daß bei diesen Konzentrationen und innerhalb der Reaktionszeit von wenigen Minuten kein HbFe^{3+} entstanden war: sowohl die Bildung des Addukt-Spektrums als auch die Extinktionszunahme bei 630 nm waren reversibel, denn nach Begasen des Küvetteninhalts mit CO verschwand der Extinktionsanstieg bei 630 nm. Es wurde das Absorptionsspektrum des Carboxyhämoglobins mit Maxima bei 536 und 567 nm gefunden, was in Gegenwart von HbFe^{3+} nicht möglich wäre.

In Inkubaten mit höheren NO-4ClB-Konzentrationen (1.0 oder 2.7 mM) und Hämoglobin (2.7 mM HbFe^{2+}) bei 37°C in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 war neben der schnellen Komplex-Bildung von NO-4ClB mit Hämoglobin auch eine langsame HbFe^{3+} -Bildung zu beobachten. Mit Hilfe der Cyanid-Methode wurden z.B. 1 min nach Zugabe einer äquimolaren Menge NO-4ClB zu einer 2.7 mM HbFe^{2+} -Lösung 21% HbFe^{3+} bestimmt und nach 60 min waren 60% des Hb oxidiert. Nach Zugabe von nur 1.0 mM NO-4ClB zur 3.1 mM HbFe^{2+} -Lösung wurde nach 1 min eine HbFe^{3+} -Konzentration von 7% bestimmt, die im Verlauf von 60 min auf 43% anstieg.

Diese Ergebnisse zeigen, daß im Anschluß an die schnelle Komplexbildung von NO-4ClB mit HbFe^{2+} eine langsame HbFe^{3+} -Bildung stattfindet, die jedoch schneller ist als die Autoxidation des Hämoglobins unter den gegebenen Bedingungen. Die langsame HbFe^{3+} -Bildung wurde sowohl mit Hilfe der Cyanid-Methode als auch anhand einer langsamen Extinktionszunahme bei 630 nm im Anschluß an den sehr schnellen Anstieg beobachtet. Diese Reaktion erinnert an den zwei-

ten Teil der biphasischen Kinetik der HbFe^{3+} -Bildung durch NOH-4ClA in Hämoglobin-Lösungen (s. 3.5. und Abb. 22). Nach Reaktion von NOH-4ClA mit HbFe^{2+} liegt NO-4ClB vor, das dann in ähnlicher Weise mit restlichem HbFe^{2+} reagieren kann, wie wenn synthetisches NO-4ClB einer HbFe^{2+} -Lösung zugesetzt wird.

3.8. Reaktionen von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Hämoglobin

3.8.1. Spektroskopische Befunde

Nach Zugabe einer äquimolaren NOH-4ClAA -Konzentration zu einer 0.11 mM Oxyhämoglobin-Lösung wurde eine langsame Extinktionszunahme bei 630 nm, gekoppelt mit einer Extinktionsabnahme bei 576 und 540 nm beobachtet, und die Soret-Bande wurde von 413 nach 404 nm verschoben, d.h. das Absorptionsspektrum von HbO_2 wurde langsam in das von HbFe^{3+} überführt.

Setzte man dagegen 0.11 oder 0.23 mM NOH-4ClAA unter Ausschluß von Luftsauerstoff in Thunberg-Küvetten zu einer Desoxyhämoglobin-Lösung (0.11 mM HbFe^{2+}), so wurden keine Veränderungen des DesoxyHb-spektrums beobachtet. Im Gegensatz zu den Versuchen unter Sauerstoff fand auch kein Extinktionsanstieg bei 630 nm statt, d.h. keine HbFe^{3+} -Bildung.

Diese Versuche zeigen, daß auch für die Oxidation von gereinigtem Hämoglobin in vitro durch NOH-4ClAA Sauerstoff notwendig ist und NOH-4ClAA kein Ligand für das Ferrohäm ist.

3.8.2. Sauerstoff als dritter Reaktionspartner

Wurde die Änderung der O_2 -Konzentration in einer Reaktionsmischung von gereinigtem Hämoglobin in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 (0.05 mM

HbFe²⁺) mit 1.3 oder 2.7 mM NOH-4ClAA mithilfe einer O₂-Elektrode (Clark-Typ) verfolgt, beobachtete man einen Anstieg der O₂-Konzentration in der Lösung, d.h. eine Freisetzung von O₂ aus der Bindung an Hämoglobin.

Während also bei der Reaktion des Arylhydroxylamins NOH-4ClA mit Hämoglobin sogar gelöster Sauerstoff zur Oxidation des Substrats und des Hämoglobins verbraucht wurde, wurde Sauerstoff während der Oxidation des Hämoglobins durch die N-Arylacetohydroxamsäure NOH-4ClAA freigesetzt. Daraus wird geschlossen, daß mehr O₂ aus der Bindung an das Hämoglobin freigesetzt als zu H₂O₂ oder H₂O reduziert wird. Die Bildung von DesoxyHb ist Voraussetzung für die Hb-Fe³⁺-Bildung.

3.9. Die Kinetik der Hämoglobin-Oxidation durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Es war nicht notwendig, die Reaktion von NOH-4ClAA mit gereinigtem Human-Hämoglobin in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 bei 37°C auch mit Hilfe einer Stopped-Flow-Apparatur zu untersuchen, da sie viel langsamer war als die von NOH-4ClA. Ihre Kinetik wurde daher anhand der Extinktionszunahme bei 630 nm mit einem Zeiss-Photometer verfolgt.

Auch bei der Reaktion von 0.057 - 0.454 mM NOH-4ClAA mit gereinigtem Human-Hämoglobin (0.055 - 0.444 mM HbFe²⁺) wurde eine lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von den Konzentrationen beider Reaktionspartner beobachtet und daraus auf eine Reaktion 2. Ordnung geschlossen (Abb. 23). Aus diesen Ergebnissen wurde eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von

$$k = 3.4 \pm 0.2 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$$

berechnet (Mittelwert aus 7 Versuchen $\pm$ S.E.). Verglichen mit der

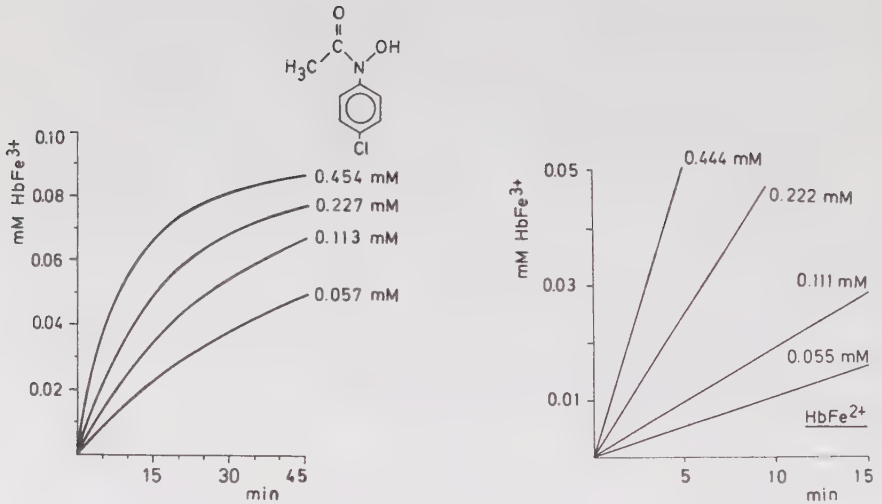


Abb. 23 Initiale Geschwindigkeit der Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloroacetanilid in Hämoglobinlösung

Die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloroacetanilid wurde anhand der Extinktionszunahme bei 630 nm in Lösungen von gereinigtem Human-Hämoglobin in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 bei 37°C verfolgt.

Abb. links: verschiedene NOH-4ClAA-Konzentrationen
0.111 mM HbFe²⁺

Abb. rechts: 0.113 mM NOH-4ClAA
verschiedene HbFe²⁺-Konzentrationen

NOH-4ClA-induzierten Hämoglobin-Oxidation war die Geschwindigkeit dieser Reaktion 2000mal langsamer.

3.10. Bestimmung der Aktivierungsenergie der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Hämoglobin

Als die Geschwindigkeit der NOH-4ClAA-induzierten Hämoglobin-Oxidation bei verschiedenen Temperaturen gemessen wurde, zeigte sich, daß die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion im Unterschied zu der durch NOH-4ClA induzierten Oxidation stärker von der Temperatur abhängig war:

<u>Temperatur (°C)</u>	<u>k (l·mol⁻¹·sec⁻¹)</u>
10	0.5
17	0.9
24	1.5
31	2.4
37	3.4

Demnach bewirkte eine Temperaturerhöhung von 17°C auf 37°C eine Erhöhung der Geschwindigkeit dieser Reaktion um das 4fache, bei der Reaktion von NOH-4ClA mit Hb dagegen nur eine Erhöhung um das 1.5-fache. Nach Auftragen von log k gegen 1/T im Arrhenius-Plot wurde eine Aktivierungsenergie von

$$E_a = 12.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

ermittelt (s. Abb. 21).

Diese Ergebnisse zeigen, daß das Arylhydroxylamin NOH-4ClA über 2000mal schneller mit gereinigtem Hämoglobin in vitro reagierte als die N-Arylacetoxyhydroxamsäure NOH-4ClAA und daß die Aktivierungs-

energie für die Reaktion der Hydroxamsäure größer war als die für das Arylhydroxylamin, Beweis für unterschiedliche Mechanismen der HbO_2 -Oxidation.

3.11. Bestimmung der katalytischen Aktivität von N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Im Gegensatz zum Arylhydroxylamin NOH-4ClA reagierte die N-Aryl-acetohydroxamsäure NOH-4ClAA zwar langsamer, aber offenbar mehrmals mit Hämoglobin.

In Lösungen gereinigten Hämoglobins (2.7mM HbFe^{2+}) oxidierte eine ne äquimolare Konzentration NOH-4ClAA ein Äquivalent HbFe^{2+} , eine kleinere Konzentration der Hydroxamsäure dagegen mehr als nur ein Äquivalent. Wenn die katalytische Aktivität nicht mehr durch die Konzentration von HbFe^{2+} limitiert war, wurden nach entsprechend langer Inkubationszeit in einer 2.7 mM HbFe^{2+} -Lösung durch 0.011 mM NOH-4ClAA bis zu 45 Äquivalente HbFe^{3+} pro mol NOH-4ClAA oxidiert (s. dazu Abb. 24). In dieser niedrigen Konzentration von 0.011 mM ist durch NOH-4ClA keine Beschleunigung der Autoxidation in der Hämoglobin-Lösung meßbar, während NOH-4ClAA innerhalb von 2 h 19% des Hämoglobins oxidierte.

Diese katalytische Aktivität der N-Arylacetohydroxamsäure in Lösungen von gereinigtem Hämoglobin beweist ebenfalls, daß der Mechanismus der Hämoglobin-Oxidation durch NOH-4ClAA in vitro von dem der NOH-4ClA-induzierten verschieden ist.

3.12. Einfluß des pH auf die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Durch Messung der Reaktionsgeschwindigkeit von NOH-4ClAA mit Hä-

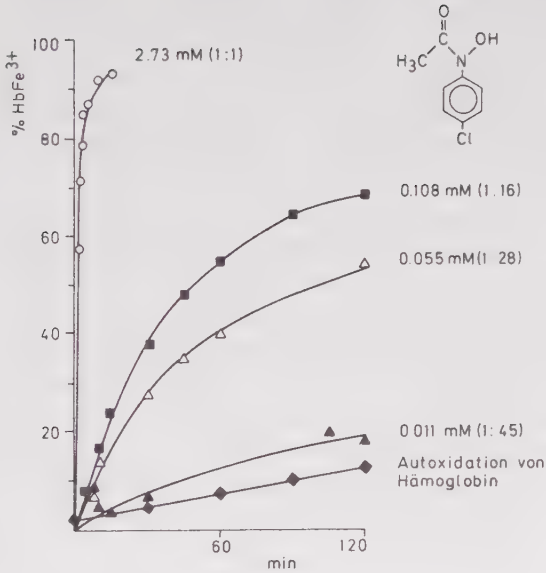


Abb. 24 Bestimmung der katalytischen Aktivität von N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Hämoglobinlösung

Verschiedene Konzentrationen N-Hydroxy-4-chloracetanilid wurden mit gereinigtem Human-Hämoglobin (2.7 mM HbFe²⁺, in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4) bei 37°C inkubiert. Die Zahlenwerte in Klammern geben das Verhältnis N-Arylaceto-hydroxamsäure zu oxidiertem HbFe²⁺ wieder (jeweils ein typisches Experiment).

Die Ergebnisse wurden um die autooxidationsbedingte Ferrihämoglobin-Bildung (◆) korrigiert.

moglobin bei verschiedenen pH-Werten sollte der Einfluß von Protonen auf diese Reaktion geprüft werden.

Während die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion 2. Ordnung von NOH-4ClAA mit Hämoglobin in 0.2 M Phosphatpuffer pH 6.0 - 8.5 bei 37°C im Bereich von 6.0 bis 7.0 innerhalb der Meßgenauigkeit gleich waren, nahmen sie bei pH-Werten > 7.4 schnell ab (Abb. 25). Die molaren Extinktionskoeffizienten von HbFe^{3+} bei den verschiedenen pH-Werten wurden jeweils berücksichtigt; das Spektrum von HbFe^{2+} ist in diesem Bereich unabhängig vom pH.

Die Reaktion von NOH-4ClAA mit Hämoglobin läuft demnach im neutralen oder schwach sauren Milieu schneller ab als im alkalischen. Eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Protonen hat dieses Ergebnis jedoch nicht bewiesen. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei einem pH > 7.4 könnte auch durch Veränderung der Tertiärstruktur des Hämoglobins, der Ionisierungsform der N-Arylacetohydroxamsäure oder des O_2 -Potentials verursacht werden. Die Bindung von O_2 an Hämoglobin ist ebenfalls abhängig vom pH und im sauren schwächer als im alkalischen Bereich.

3.13. Einfluß von Katalase auf die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Durch Zusatz von Katalase zu Hämoglobin-Lösungen sollte geprüft werden, ob H_2O_2 bei der Reaktion von NOH-4ClAA mit Hämoglobin entsteht und die Hb-Oxidation beschleunigt. Da Katalase einen Abbau von H_2O_2 bewirkt, sollte die Geschwindigkeit der Hb-Oxidation bei Anwesenheit von Katalase abnehmen.

0.11 mM NOH-4ClAA produzierte in einer Hämoglobin-Lösung (0.11 mM HbFe^{2+}) bei 37°C in Abwesenheit von Katalase 51 nM HbFe^{3+} pro sec. In Anwesenheit von verschiedenen Katalase - Konzentrationen (600 - 3000 k pro g Hb) wurde aber keine signifikante Veränderung der Re-

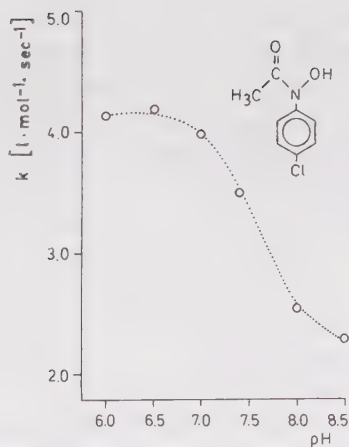


Abb. 25 Geschwindigkeit der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Hämoglobin in Abhängigkeit vom pH

0.11 oder 0.22 mM N-Hydroxy-4-chloroacetanilid wurde mit gereinigtem Human-Hämoglobin (0.07–0.16 mM HbFe²⁺, in 0.2 M Phosphatpuffer) bei 37°C und pH 6.0–8.5 inkubiert (jeweils 6 Experimente).

aktionsgeschwindigkeit beobachtet:

<u>Katalase-Konzentration</u> k/g Hb	nM HbFe ³⁺ /sec
40	44
550	49
600	47
3300	53

Es wurde eine mittlere Bildungsgeschwindigkeit von 48 nM HbFe³⁺ pro sec ermittelt, die 94% der ohne Katalase gemessenen Aktivität entsprach. Eine Korrelation mit der Katalase-Konzentration war nicht erkennbar.

Katalase hatte demnach keinen signifikanten Einfluß auf die Geschwindigkeit der NOH-4ClAA-induzierten HbFe³⁺-Bildung, was gegen eine Beteiligung von größeren H₂O₂-Konzentrationen spricht. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß die Aktivität der Katalase bei sehr kleinen H₂O₂-Konzentrationen gering ist (Cohen & Hochstein, 1963).

3.14. Einfluß von Superoxid-Dismutase auf die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Diese Versuche sollten zeigen, ob ein Zusatz von Superoxid-Dismutase die Geschwindigkeit der Ferrihämoglobinbildung durch NOH-4ClAA beeinflusst, d.h., ob bei der Autoxidation von Oxyhämoglobin entstehendes Superoxid direkt an der Hämoglobin-Oxidation durch die N-Arylacetohydroxamsäure beteiligt ist.

In einer Hämoglobin-Lösung (0.11 mM HbFe²⁺) wurden durch Zugabe von 0.11 mM NOH-4ClAA bei 37°C 57 ± 2 nM HbFe³⁺/sec oxidiert (Mittelwert aus 12 Versuchen). Wurde vor der NOH-4ClAA - Zugabe SOD zugesetzt (1000 U/ml = 600 U pro g Hb), nahm die Geschwindigkeit der HbFe³⁺-Bildung auf 51 ± 1 nM/sec ab (Mittelwert aus 14 Versuchen).

Die Geschwindigkeit der Autoxidation von Hämoglobin betrug mit und ohne Zusatz von SOD 3 bzw. 4 nM HbFe³⁺/sec.

Superoxid-Dismutase in einer Lösung von gereinigtem Hämoglobin verringerte also die Geschwindigkeit der durch NOH-4ClAA induzierten Ferrihämoglobin-Bildung um maximal 10%.

In einem weiteren Versuch wurden 0.11 mM NOH-4ClAA zu einer teilweise autoxydierten Hämoglobin-Lösung (0.11 mM HbFe²⁺) gegeben, die bereits 15% HbFe³⁺ enthielt, und eine Geschwindigkeit der HbFe³⁺-Bildung von 27 nM HbFe³⁺ pro sec bestimmt. Wurde vor Zugabe der Hydroxamsäure wieder SOD zugesetzt (900 U/ml), nahm die Geschwindigkeit der Hämoglobin-Oxidation auf 18 nM HbFe³⁺ pro sec ab. Die Geschwindigkeit der bei diesem Versuch beschleunigten Autoxidation von Hämoglobin mit und ohne Zusatz von SOD wurde jeweils berücksichtigt. Wurde dagegen synthetisches HbFe³⁺ mit einer HbFe²⁺-Lösung gemischt (50% HbFe³⁺), so konnte keine so deutliche Hemmung der NOH-4ClAA-induzierten Hb-Oxidation durch SOD beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigten, daß SOD keinen deutlichen Einfluß auf die Geschwindigkeit der NOH-4ClAA-induzierten Hämoglobin-Oxidation hatte.

3.15. Einfluß von NADH oder NADPH auf die Reaktion von Nitroso-4-chlorbenzol und N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Gab man eine 0.11 mM NO-4ClB-Lösung zu einer Hämoglobin-Lösung (0.11 mM HbFe²⁺), so beobachtete man eine sofortige Extinktionszunahme bei 630 nm, die entsprechend den unter 3.7. beschriebenen Ergebnissen auf eine Extinktionserhöhung im Zusammenhang mit der Bildung des NO-4ClB - Hämoglobin - Komplexes zurückzuführen war. Daran schloß sich eine langsame HbFe³⁺-Bildung an.

Wurde zu dieser Reaktionsmischung 1 mM NADH oder NADPH gegeben,

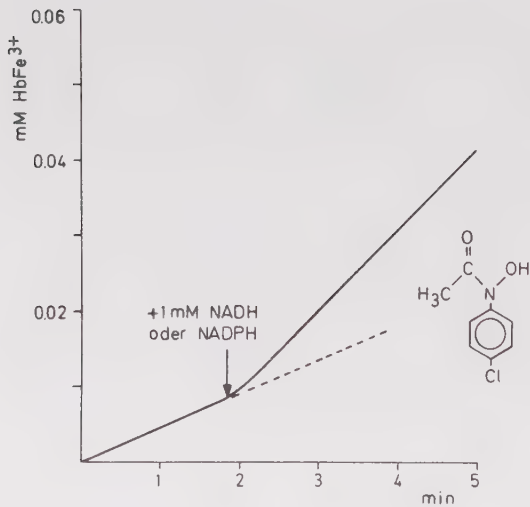


Abb. 26 Einfluß von NAD(P)H auf die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Hämoglobinlösung

0.11 mM N-Hydroxy-4-chloracetanilid wurde mit gereinigtem Human-Hämoglobin (0.11 mM HbFe²⁺, in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4) bei 37°C inkubiert. Nach 2 min wurde 1 mM NADH oder 1 mM NADPH zugesetzt.

Die autoxidationsbedingte Ferrihämoglobin-Bildung mit und ohne NAD(P)H-Zusatz wurde abgezogen.

erhielt man sofort 0.11 mM HbFe^{3+} , also 100% Ferrihämoglobin. Durch Reduktion von NO-4ClB durch NADH oder NADPH war NOH-4ClA entstanden, das sofort mit Hämoglobin in einer gekoppelten Oxidation reagierte.

1 mM NADH oder NADPH in einer Lösung von gereinigtem Hämoglobin (0.11 mM HbFe^{2+}) beschleunigte aber auch dessen Autoxidation. In Gegenwart von 1 mM NADH wurden 12 nM HbFe^{3+} , in Gegenwart von 1 mM NADPH sogar 38 nM HbFe^{3+} pro sec produziert, im Gegensatz zu 5 nM HbFe^{3+} pro sec, die bei 37°C ohne Zusätze durch Autoxidation gebildet wurden.

Falls bei der Reaktion von NOH-4ClAA mit Hämoglobin auch NO-4ClB entsteht, müßte ein Zusatz von NADH oder NADPH die Oxidation von Hämoglobin beschleunigen.

0.11 mM NOH-4ClAA in einer Hämoglobin-Lösung (0.11 mM HbFe^{2+}) erzeugten bei 37°C 56 nM HbFe^{3+} pro sec (Mittelwert aus 6 Versuchen). In Gegenwart von 1 mM NADPH wurden 156 nM HbFe^{3+} pro sec, in Gegenwart von 1 mM NADH 154 nM HbFe^{3+} pro sec gebildet, die Geschwindigkeit der Hämoglobin-Oxidation wurde also verdreifacht (Abb. 26). Die Autoxidation des Hämoglobins ist bei diesen Zahlen berücksichtigt.

Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß bei der HbFe^{3+} -Bildung durch NOH-4ClAA auch NO-4ClB entsteht, aus dem durch NADH/NADPH das das aktive Ferrihämoglobin-bildende Arylhydroxylamin gebildet wird.

3.16. Bedeutung der SH-Gruppen im Hämoglobin bei der Reaktion mit N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Diese Versuche wurden durchgeführt, um zu prüfen, ob bei der NOH-4ClAA-induzierten Hämoglobin-Oxidation die Bindung von Ausgangsma-

terial, reaktiven Zwischenstufen oder Endprodukten an die SH-Gruppen im Hämoglobin-Molekül eine Rolle spielt. Deshalb wurde a) die Anzahl der freien SH-Gruppen im Hämoglobin während der Reaktion mit NOH-4ClAA bestimmt und b) die Geschwindigkeit der NOH-4ClAA-induzierten Oxidation von nativem Hämoglobin verglichen mit der von Hämoglobin, dessen SH-Gruppen durch pCMB blockiert waren.

3.16.1. Bestimmung der freien Hämoglobin-SH-Gruppen nach Reaktion mit N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Eine Hämoglobin-Lösung (3.1 mM HbFe^{2+}) wurde mit einer äquimolaren Konzentration von NOH-4ClAA versetzt und bei 37°C inkubiert. Parallel zur Zunahme der HbFe^{3+} -Konzentration wurde die Anzahl der freien SH-Gruppen im Hämoglobin zu Beginn des Versuchs und nach 5, 10, 15, 30 und 60 min bestimmt. Während die HbFe^{3+} -Konzentration innerhalb von 15 min bereits auf 97% zunahm, blieb die Anzahl der titrierbaren SH-Gruppen praktisch unverändert,

0 min	97%
5 min	91%
10 min	96%
15 min	87%
30 min	98%
60 min	86%

(Mittelwerte aus 2 Versuchen)

d.h. es wurde keine Abnahme der freien SH-Gruppen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer beobachtet. Die Abweichungen der Meßwerte von 100% war durch die Meßmethode bedingt.

Aus diesen Ergebnissen wurde daher geschlossen, daß weder NOH-4ClAA noch einer seiner Metabolite (z.B. NO-4ClB) die SH-Gruppen im Hämoglobin-Molekül während der Reaktion blockiert.

Nach 2 und 60 min Inkubation von 1 mM NOH-4ClAA in 0.2 M Phosphat-Puffer pH 7.4 bei 37°C in Gegenwart von 1 mM Cystein wurde die Hydroxamsäure zu 92 bzw. 98% unverändert wiedergefunden. Nach Inkubation in Gegenwart von 1 mM Glutathion wurden jeweils 85% NOH-4ClAA bestimmt. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis, daß keine Reaktion von NOH-4ClAA mit SH-Gruppen stattfindet.

3.16.2. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chlor-acetanilid in Hämoglobin mit blockierten SH-Gruppen

Die HbFe^{3+} -Bildung durch NOH-4ClAA wurde in einer Lösung von gereinigtem Hämoglobin untersucht, bei dem alle SH-Gruppen durch pCMB blockiert waren. Bei der Messung der Reaktionsgeschwindigkeit anhand der Extinktionszunahme bei 630 nm wurde für eine 0.08-0.11 mM Lösung pCMB-behandelten Hämoglobins mit 0.11-0.28 mM NOH-4ClAA eine Geschwindigkeitskonstante $k = 9.0 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ bestimmt (Mittelwert aus 3 Versuchen). In einer Lösung unbehandelten Hämoglobins (0.11-0.17 mM HbFe^{2+}) wurde bei 37°C und den gleichen Substratkonzentrationen ein $k = 4.2 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ bestimmt.

Es ist bekannt, daß die Autoxidation von Hämoglobin, dessen SH-Gruppen mit pCMB blockiert sind, schneller ist als die von nativem Hämoglobin. In Kontrollexperimenten wurde eine doppelt so schnelle Autoxidation für pCMB-behandeltes Hämoglobin mit 6 nM $\text{HbFe}^{3+}/\text{sec}$ beobachtet gegenüber 3 nM $\text{HbFe}^{3+}/\text{sec}$ für unbehandeltes Hämoglobin. Doch selbst bei Korrektur obiger Werte um die Geschwindigkeit der Autoxidation bleibt eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit von NOH-4ClAA mit HbpCMB um den Faktor 2.

3.17. Bindung von N-Hydroxy-4-chloracetanilid an Hämoglobin

Um zu prüfen, ob NOH-4ClAA oder seine reaktiven Metabolite an Hä-

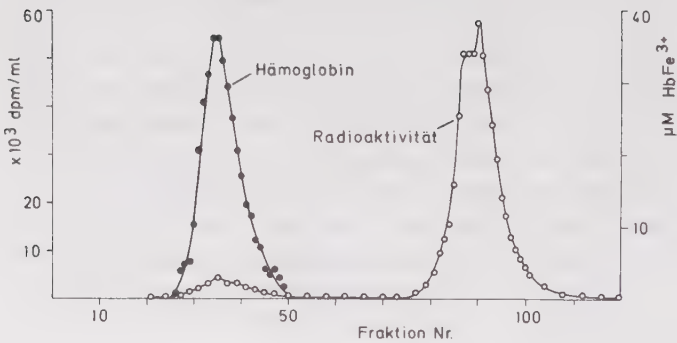


Abb. 27 Elutionsprofil von Hämoglobin und Radioaktivität nach Reaktion von [¹⁴C]N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Hämoglobin

[¹⁴C]N-Hydroxy-4-chloracetanilid (3.17 mM) wurde mit gereinigtem Human-Hämoglobin (3.17 mM HbFe²⁺, in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4) 60 min bei 37°C inkubiert und mit 2 mM Phosphatpuffer pH 7.4 an Sephadex^R G 75 fine (2.5 x 40 cm) bei 4°C chromatographiert (1 typischer Versuch).

- Radioaktivität
- Hämoglobin-Konzentration

moglobin gebunden werden, wurde ^{14}C -markiertes NOH-4ClAA (3.17 mM; spezifische Aktivität 2700 dpm/ml) mit gereinigtem Human-Hb in 0.2M Phosphatpuffer pH 7.4 bei 37°C inkubiert. Nach 2 und 60 min wurden Proben entnommen und an Sephadex^R G75 chromatographiert (2 mM Phosphatpuffer pH 7.4). Das Eluat wurde in Fraktionen a 5 ml gesammelt und während der Chromatographie die optische Dichte bei 254 nm mit einem Uvicord UV-Detektor gemessen. Im Elutionsprofil waren zwei Peaks zu sehen, der erste enthielt die Hb-haltigen Fraktionen, der zweite zeigte die Elution der Hydroxamsäure und ihrer Metabolite an. Der Hb-Gehalt der betreffenden Fraktionen wurde mit Cyanhä-moglobin-Reagens aus der Extinktion bei 540 nm bestimmt (Abb. 27). Diese Fraktion enthielt nach 2 min 77% des Hämoglobins und 1.5% der in Form von NOH-4ClAA eingesetzten Radioaktivität, nach 60 min 76% Hb und 4.7% Radioaktivität. Die zweite, Hämoglobin-freie Fraktion enthielt nach 2 min 80% und nach 60 min 81% der eingesetzten Radioaktivität. Die Radioaktivität dieser Fraktion war zu 91% mit Ether extrahierbar. Mit 2 N NaOH wurden die Bestandteile der Etherextrakte in saure Stoffe (Ether II; NOH-4ClAA) und neutrale/basische Verbindungen (Ether I; 4ClAA, NO-4ClB, BAClB) getrennt. Die Ether I enthielten nach 2 min 10% und nach 60 min 15% der Radioaktivität, in den Ether II wurden nach 2 min 80% und nach 60 min 77% gefunden.

Auch diese Versuche zeigten, daß NOH-4ClAA oder seine Metabolite nur in sehr geringem Ausmaß an Hämoglobin gebunden werden.

3.18. Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Um den Mechanismus der Reaktion von N-Arylaceto-hydroxamsäuren mit Hämoglobin in vitro kennenzulernen, wurden Lösungen von gereinigtem Hb in 0.2 M Phosphatpuffer nach der Reaktion mit NOH-4ClAA bei 37°C auf Umsetzungsprodukte hin untersucht. Da der Hauptbestandteil der nach der Reaktion isolierten Verbindungen die unveränderte N-Aryl-aceto-hydroxamsäure selbst war und Umsetzungsprodukte nur in sehr kleinen Konzentrationen gefunden wurden, wurden die Etherextrakte

Tabelle 8

Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit gereinigtem Oxyhämoglobin, Oxyhämoglobin mit blockierten SH-Gruppen, Carboxyhämoglobin, Ferrihämoglobin und Globin

NOH-4CLAA (mM)	3.13 mM HbO ₂		3.11 mM HbpCMB		1.0 mM HbCO		2.6 mM HbFe ³⁺		0.42 mM Globin		Kontrolle	
	1.05		1.08		1.0		1.0		1.02		1.0	
t (min)	2	60	2	60	60	2	60	2	60	2	60	

HbFe ³⁺ (%)	42	96	64	100	-	100	100	-	-	-	-	-
NOH-4CLAA (%)	75.6	73.9	79.3	77.7	87.2	76.2	75.0	83.0	90.0	93.6		
(wiedergefunden)												
4CLAA (%)	1.8	5.0	0.8	0.3	0.1	0.7	1.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
NO-4CLB (%)	0.9	0.5	0.5	0.4	0.3	0.6	0.6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
NO ₂ -4CLB (%)	0.7	0.4	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
4CLA (%)	*)	*)	*)	*)	*)	*)	*)	*)	*)	*)	*)	*)

N-Hydroxy-4-chloracetanilid wurde mit HbO₂, HbpCMB, HbCO, HbFe³⁺ und Globin in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 bei 37°C inkubiert (Kontrolle in Phosphatpuffer). Die Zahlenwerte sind Mittel aus 4 (HbCO, HbFe³⁺, Kontrolle), 3 (HbO₂) bzw. 2 (HbpCMB, Globin) Versuchen.

*) Spuren, nicht zweifelsfrei identifiziert

der Hb-Lösungen nach Abtrennung der Hydroxamsäure mithilfe der HPLC analysiert (Zusammenfassung s. Tab. 8).

3.18.1. mit Oxyhämoglobin

Inkubierte man 1.05 mM NOH-4ClAA in Lösungen von gereinigtem Hämoglobin (3.13 mM HbFe²⁺) bei 37°C unter Luftsauerstoff, jedoch in einem geschlossenen Gefäß, so fand man nach 2 min 42%, nach 60 min 96% HbFe³⁺. NOH-4ClAA wurde nach 2 min zu 794 µM (75.6%), nach 60 min zu 776 µM (73.9%) zurückgewonnen. Folgende Umsetzungsprodukte wurden in wesentlich geringeren Konzentrationen gefunden:

	nach 2 min	nach 60 min
4ClAA	19 µM (1.8%)	53 µM (5.0%)
NO ₂ -4ClB	7 µM (0.7%)	4 µM (0.4%)
NO-4ClB	9 µM (0.9%)	5 µM (0.5%)

(Mittelwerte aus 3 Versuchen)

Während die Konzentration von 4ClAA im Verlauf der Reaktion anstieg, nahm die Konzentration von NO-4ClB- und NO₂-4ClB ab. Die Ursache dafür ist, daß 4ClAA im Gegensatz zu NO-4ClB und NO₂-4ClB nicht flüchtig und auch nicht reaktiv ist und so im Verlauf der Reaktion kumuliert. Die unter 3.6. beschriebenen Versuche zeigten, daß 70-80% NO-4ClB im Verlauf von 2-60 min Inkubation verschwanden.

3.18.2. mit Oxyhämoglobin mit blockierten SH-Gruppen

Nach Inkubation von 1.08 mM NOH-4ClAA bei 37°C in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 mit Hämoglobin (3.11 mM HbFe²⁺), dessen SH-Gruppen durch pCMB blockiert waren, fand man nach 2 min 64%, nach 60 min

100% HbFe³⁺. Nach 2 min wurden 856 μ M NOH-4ClAA (79.3%), nach 60 min 839 μ M NOH-4ClAA (77.7%) wiedergefunden. Von den Reaktionsprodukten von NOH-4ClAA wurden gefunden:

	nach 2 min	nach 60 min
4ClAA	8 μ M (0.8%)	3 μ M (0.3%)
NO ₂ -4ClB	1 μ M (0.1%)	1 μ M (0.1%)
NO-4ClB	5 μ M (0.5%)	4 μ M (0.4%)

(Mittelwerte aus 2 Versuchen)

Diese Ergebnisse zeigten, daß durch die Blockade der SH-Gruppen die Konzentration der Umsetzungsprodukte erniedrigt, die HbFe³⁺-Bildung und die Konzentration der wiedergefundenen Hydroxamsäure dagegen erhöht war. Die vollständige Oxidation des HbFe²⁺ bei gleichzeitig verminderter Produktbildung könnte ein Hinweis darauf sein, daß der aktivierte Sauerstoff im Gegensatz zur Reaktion mit nativem Hämoglobin das Substrat nicht erreicht und deshalb eine Dreizentren-Reaktion zur Bildung der Produkte von NOH-4ClAA erschwert ist.

3.18.3. mit Carbonylhämoglobin

Inkubierte man eine Lösung von gereinigtem HbCO (1.0 mM) mit 1.0 mM NOH-4ClAA 60 min bei 37°C in einer CO-Atmosphäre, so wurde keine HbFe³⁺-Bildung beobachtet. In den Etherextrakten der HbCO-Lösung wurden 872 μ M NOH-4ClAA (87.2%) wiedergefunden. Mit HPLC wurden folgende Umsetzungsprodukte bestimmt:

	nach 60 min	
4ClAA	1 μ M (0.1%)	
NO ₂ -4ClB	1 μ M (0.1%)	
NO-4ClB	3 μ M (0.3%)	(Mittelwerte aus 4 Versuchen)

Ebenso wie bei Inkubation von NOH-4ClAA mit Globin (3.18.5.) wurden bei 60 min Inkubation mit HbCO nur so geringe Konzentrationen der drei Oxidationsprodukte gebildet, wie sie auch bei Inkubation ohne Hämoglobin bestimmt wurden. Blockade des Ferrohäms durch CO unter anaeroben Bedingungen verhindert also vollständig die Bildung von Produkten.

3.18.4. mit Ferrihämoglobin

Inkubierte man 1.0 mM NOH-4ClAA mit gereinigtem Ferrihämoglobin (2.6 mM HbFe^{3+}) bei 37°C, fand man weder nach 2 noch nach 60 min eine Reduktion des dreiwertigen Eisens zu HbFe^{2+} . Nach 2 min wurden 762 μM (76.2) und nach 60 min 750 μM (75.0%) des NOH-4ClAA unverändert wiedergefunden. Mit Hilfe der HPLC wurden bestimmt:

	nach 2 min	nach 60 min
4ClAA	7 μM (0.7%)	15 μM (1.5%)
NO_2 -4ClB	2 μM (0.2%)	1 μM (0.1%)
NO-4ClB	6 μM (0.6%)	6 μM (0.6%)

(Mittelwerte aus 4 Versuchen)

Die Konzentration der Umsetzungsprodukte war nach Reaktion von NOH-4ClAA mit Ferrihämoglobin kleiner als bei den Versuchen mit Oxyhämoglobin. Das bedeutet, daß in geringem Umfang eine Oxidation von NOH-4ClAA durch HbFe^{3+} stattgefunden hat. Die Entstehung von HbFe^{2+} konnte unter aeroben Bedingungen nicht nachgewiesen werden, da es vermutlich sofort wieder zu HbFe^{3+} oxidiert wurde.

3.18.5. mit Globin

1.02 mM NOH-4ClAA wurde in einer Lösung von gereinigtem Globin (0.42 mM) 60 min bei 37°C inkubiert und in den Etherextrakten der Reaktionsmischung nach Umsetzungsprodukten gesucht. Diese Versuche sollten zeigen, ob auch die Proteinkomponente des Hämoglobins ohne Beteiligung des Häm-Eisens mit NOH-4ClAA reagiert.

Nach 60 min wurden 870 µM NOH-4ClAA (83%) wiedergefunden. Mithilfe der HPLC wurden folgende Konzentrationen von Umsetzungsprodukten bestimmt:

nach 60 min

4ClAA	1 µM (0.1%)
NO ₂ -4ClB	1 µM (0.1%)
NO-4ClB	1 µM (0.1%)

(Mittelwerte aus 2 Versuchen)

Dieses Ergebnis glich dem, das man nach Inkubation von 1.0 mM NOH-4ClAA in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 erhielt. Nach 2 min wurden 898 µM (90%), nach 60 min 936 µM (93.6%) NOH-4ClAA wiedergefunden. Mit HPLC wurden außerdem bestimmt:

nach 2 min

nach 60 min

4ClAA	1 µM (0.1%)	1 µM (0.1%)
NO ₂ -4ClB	1 µM (0.1%)	1 µM (0.1%)
NO-4ClB	1 µM (0.1%)	1 µM (0.1%)

(Mittelwerte aus 4 Versuchen)

Inkubation von NOH-4ClAA in Puffer bei 37°C in Gegenwart von 1 mM NADPH lieferte nach 60 min das gleiche Ergebnis.

3.19. Kinetik der Hämoglobin-Oxidation durch verschiedene N-Arylacetoxyhydroxamsäuren

Um zu prüfen, ob auch andere N-Arylacetoxyhydroxamsäuren Hämoglobin in vitro oxidieren können, wurde die Geschwindigkeit der Reaktionen verschiedener N-Arylacetoxyhydroxamsäuren mit Hämoglobin bei 37°C in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4 gemessen.

Die N-Arylacetoxyhydroxamsäuren NOH-AA, NOH-4ClAA, NOH-3.4DClAA, NOH-4EAA, NOH-4AABi und NOH-2AAF wurden dabei in Konzentrationen von 0.11, 0.22, 0.33, 0.44 und 0.52 mM zu Hämoglobin-Lösungen (0.11 0.21 und 0.73 mM HbFe²⁺) gegeben und die Kinetik der HbFe³⁺-Bildung anhand der Extinktionszunahme bei 630 nm verfolgt (s. Abb. 28). Alle Hydroxamsäuren oxidierten gereinigtes Human-Hämoglobin, allerdings mit unterschiedlicher initialer Geschwindigkeit. Es wurde folgende Reihenfolge der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung gefunden:

	k (l.mol ⁻¹ .sec ⁻¹)	n
NOH-AA	0.5 ± 0.02	14
NOH-4EAA	1.2 ± 0.03	10
NOH-2AAF	2.6 ± 0.1	10
NOH-4ClAA	3.4 ± 0.2	36
NOH-4AABi	3.6 ± 0.2	14
NOH-3.4DClAA	5.0 ± 0.2	5

(Mittelwerte aus n Versuchen)

Am langsamsten war die Reaktion von dem unsubstituierten NOH-AA mit Hämoglobin, es folgten NOH-4EAA und NOH-2AAF, NOH-4AABi reagierte ungefähr so schnell wie NOH-4ClAA, und am schnellsten war die Reaktion von NOH-3.4DClAA mit Hämoglobin. Die Geschwindigkeit der Hb-Oxidation war abhängig von den Konzentrationen beider Reaktionspartner. Als Ursachen für die unterschiedlichen initialen Geschwindigkeiten wurden eher unterschiedliche dielektrische Eigenschaften

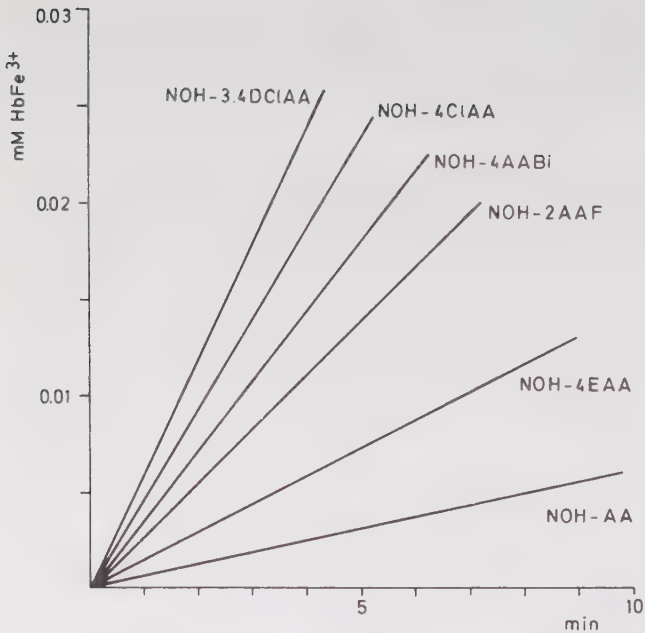


Abb. 28 Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylaceto-hydroxamsäuren in Hämoglobinlösung

Die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-acetanilid, N-Hydroxy-phenacetin, N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren, N-Hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, N-Hydroxy-4-chloracetanilid und N-Hydroxy-3,4-dichloracetanilid (jeweils 0.11 mM) wurde anhand der Extinktionszunahme bei 630 nm in Lösungen von gereinigtem Human-Hämoglobin (0.21 mM HbFe^{2+} in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4) bei 37°C verfolgt (jeweils ein typisches Experiment).

der N-Arylacetohydroxamsäuren als unterschiedliches elektrochemisches Verhalten vermutet (Redoxpotentiale der Einelektronen-Oxidation von N-Arylacetohydroxamsäuren bei Riedl, 1983).

3.20. Bestimmung der katalytischen Aktivität von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren

Die Fähigkeit zur katalytischen Hämoglobin-Oxidation wurde auch mit der polycyclischen N-Arylacetohydroxamsäure NOH-2AAF, dem schwächsten HbFe^{3+} -Bildner in vivo, untersucht (Abb. 29).

1.04 mM NOH-2AAF oxidierte innerhalb von 60 min 86% des Hämoglobins in einer Lösung, die 3.13 mM HbFe^{2+} enthielt. Daraus wurde eine katalytische Aktivität von 3 Äquivalenten HbFe^{3+} pro mol NOH-2AAF berechnet, die aber durch die Konzentration des Hämoglobins limitiert war und wahrscheinlich bei kleineren NOH-2AAF-Konzentrationen noch höher ist. Ein Vergleich mit der katalytischen Aktivität von NOH-4ClAA unter den gleichen experimentellen Bedingungen zeigt, daß NOH-2AAF weniger aktiv war als NOH-4ClAA.

3.11. Reaktionsprodukte von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren

1.04 mM NOH-2AAF produzierte in einer Hb-Lösung (3.13 mM HbFe^{2+}) innerhalb von 2 min 13.2% HbFe^{3+} , in 60 min 85.9% HbFe^{3+} . Nach 2 min wurden in den Etherextrakten des Inkubats 208 μM NOH-2AAF (20%) wiedergefunden, nach 60 min nur noch 43 μM NOH-2AAF (4%). Außerdem wurden mit Hilfe der HPLC bestimmt:

	nach 2 min	nach 60 min
2AAF	97 μM (9%)	140 μM (13%)
2AAF-9on	5 μM (0.5%)	6 μM (0.6%)

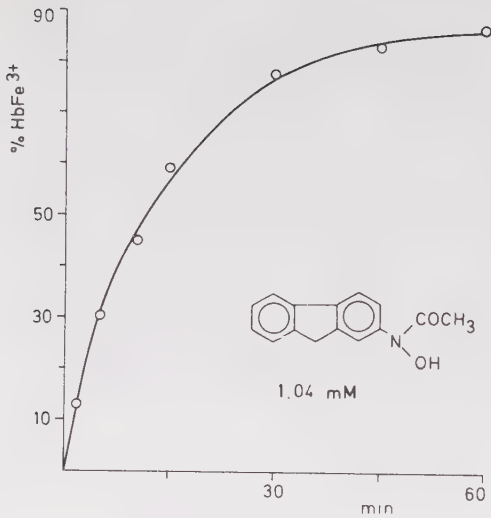


Abb. 29 Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren in Hämoglobinlösung

N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren wurde mit gereinigtem Human-Hämoglobin (3.13 mM HbFe²⁺, in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7.4) bei 37°C inkubiert.

Die Symbole sind Mittel aus 2 Experimenten (Autoxidation abgezogen).

Chromatographie der Etherextrakte mit den sauren Verbindungen zeigte neben NOH-2AAF noch weitere Verbindungen in sehr kleinen Konzentrationen, die nicht weiter analysiert wurden, weil keine Identifizierung möglich war.

Während im Vergleich zu den Versuchen mit NOH-4ClAA weniger Ausgangsmaterial wiedergefunden wurde, bestimmte man mehr formales Reduktionsprodukt N-Arylacetamid. Die negative Massenbilanz, die bei NOH-2AAF größer war als bei NOH-4ClAA, deutet auf stärkere Bindung an das Hämoglobin-Molekül hin (Weisburger et al., 1966).

4. In-vitro-Versuche mit Lebermikrosomen

Die Biotransformation von Arylaminen und Arylhydroxylaminen durch Lebermikrosomen wurde untersucht im Vergleich zur Biotransformation durch Erythrozyten bzw. durch Hämoglobin.

4.1. N- und Ring-Hydroxylierung von 4-Chloranilin und 3.4-Dichloranilin

In Inkubaten von Rindererythrozyten mit Arylaminen wurde Hydroxylierung am Stickstoff und am Benzolring beobachtet. Da aromatische Amine auch durch Lebermikrosomen N- und Ring-hydroxyliert werden, schien interessant, die Geschwindigkeit der beiden Reaktionen zu vergleichen. Gleichzeitig interessierte, ob N- und C-Oxygenierung der Arylamine von der gleichen oder von verschiedenen Formen von Cytochrom P-450 katalysiert werden. Die Versuche wurden deshalb mit Lebermikrosomen von unbehandelten, PB- oder 3MCh-behandelten Kaninchen mit 4ClA und 3.4DClA durchgeführt.

Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse von Versuchen mit 1 mM 3.4DClA oder 4ClA und Lebermikrosomen von unbehandelten, PB- oder 3MCh-behandelten Kaninchen in Anwesenheit eines NADPH-regenerierenden Systems. Die Reaktionszeit betrug 30 min bei 37°C, die Proteinkonzentration 1-3 mg/ml. Die Werte geben die Bildungsgeschwindigkeit der N- und Ring-hydroxylierten Produkte in nmol pro min und mg mikrosomalem Protein ($\pm$ Standardabweichung) wieder.

4ClA wurde von Lebermikrosomen von unbehandelten Kaninchen schneller am Stickstoff (NOH-4ClA) als in o-Stellung zur Aminogruppe (2-OH-4ClA) hydroxyliert. Aus 3.4DClA dagegen entstand mehr o-Aminophenol (2-OH-3.4DClAA, 6-OH-3.4DClA) als Arylhydroxylamin (NOH-3.4DClA).

Mit Lebermikrosomen von 3MCh-induzierten Kaninchen wurden für

Tabelle 9 N- und Ring-Hydroxylierung von 4-Chloranilin und 3,4-Dichloranilin in Mikrosomensuspensionen

	<u>unbehandelt</u>	<u>PB-behandelt</u>	<u>3MCh-behandelt</u>
<u>4-Chloranilin</u>			
N-Hydroxy- 4-chloranilin	0.60 ± 0.09 (5)	2.67 ± 0.50 (10)	0.52 ± 0.13 (3)
2-Hydroxy- 4-chloranilin	0.40 ± 0.09 (4)	0.19 ± 0.03 (7)	0.43 ± 0.03 (4)
<u>3,4-Dichloranilin</u>			
N-Hydroxy- 3,4-dichloranilin	0.40 ± 0.05 (3)	0.72 ± 0.13 (9)	0.38 ± 0.18 (3)
2-Hydroxy- 3,4-dichloranilin	0.17 ± 0.02 (4)	0.11 ± 0.01 (8)	0.36 ± 0.03 (4)
6-Hydroxy- 3,4-dichloranilin	0.43 ± 0.07 (4)	0.25 ± 0.02 (8)	0.52 ± 0.03 (4)

Zahlenwerte in nmol pro min und mg mikrosomalem Protein ± S.E.
Anzahl der Versuche in Klammern

1 mM 4-Chloranilin und 3,4-Dichloranilin wurden mit Lebermikrosomen von unbehandelten, PB-behandelten und 3MCh-behandelten Kaninchen (1-2 mg Protein/ml, in 1/15 M Phosphatpuffer pH 7.4) 30 min bei 37°C inkubiert.

4ClA als Substrat die gleichen Ergebnisse wie mit Lebermikrosomen von unbehandelten Kaninchen erhalten: die N-Hydroxylierung war gegenüber der Ring-Hydroxylierung zwar etwas bevorzugt, beide Reaktionen liefen aber nicht schneller ab als mit Mikrosomen von unbehandelten Tieren. 3.4DClA wurde dagegen durch Lebermikrosomen von 3MCh-behandelten Kaninchen schneller in beiden o-Positionen zur Aminogruppe am Benzolring hydroxyliert. Die N-Hydroxylierung war gegenüber der Ring-Hydroxylierung noch deutlicher verlangsamt.

Mit Lebermikrosomen von PB-behandelten Kaninchen war die Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung von 4ClA deutlich größer, die der Ring-Hydroxylierung dagegen kleiner als mit Mikrosomen von Kontrolltieren. Auch 3.4DClA wurde schneller am Stickstoff und langsamer am Benzolring oxygeniert. Die N-Oxygenierung von beiden Substraten war gegenüber der C-Oxygenierung bevorzugt.

Bei der Diskussion dieser Ergebnisse ist zu beachten, daß Tab. 7 die Ergebnisse einer 30 min Inkubation enthält. Die initiale Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung sowohl von 4ClA als auch von 3.4DClA war aber sehr viel größer und wurde bereits nach wenigen Minuten langsamer. Besonders deutlich war dieser Effekt mit Lebermikrosomen von PB-induzierten Kaninchen zu beobachten (Abb. 30a). Im Verlauf von 60 min nahm sogar die Konzentration des Produkts ab, was mit einem Verbrauch des gebildeten Arylhydroxylamins für die umgekehrte Reaktion (Reduktion zum Arylamin, s. 4.2.) erklärt wurde zumal die initiale Geschwindigkeit der Reduktion größer ist als die der N-Hydroxylierung. Bei der Aminophenol-Bildung war dagegen die Abweichung von der initialen Geschwindigkeit innerhalb von 30 min nicht so stark wie bei der N-Hydroxylierung (Abb. 30b).

Im Verlauf von max. 60 min Reaktionszeit wurden 69-73% des zugesetzten Arylamins unverändert, 4-8% dagegen als N- oder C-oxygeniertes Produkt wiedergefunden. Insgesamt wurden ca. 77% der eingesetzten Verbindung zurückgewonnen.

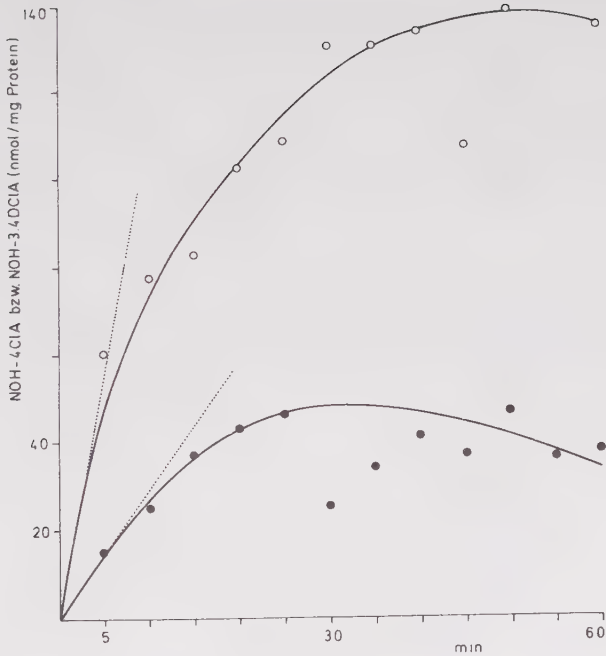


Abb. 30a N-Hydroxylierung von 4-Chloranilin und 3,4-Dichloranilin in Mikrosomensuspension

4-Chloranilin (o) und 3,4-Dichloranilin (●) (jeweils 1 mM) wurden mit Lebermikrosomen von PB-behandelten Kaninchen (suspendiert in 1/15 M Phosphatpuffer pH 7.4, 1 mg Protein/ml) in Anwesenheit eines NADPH-regenerierenden Systems bei 37°C inkubiert (jeweils ein typisches Experiment).

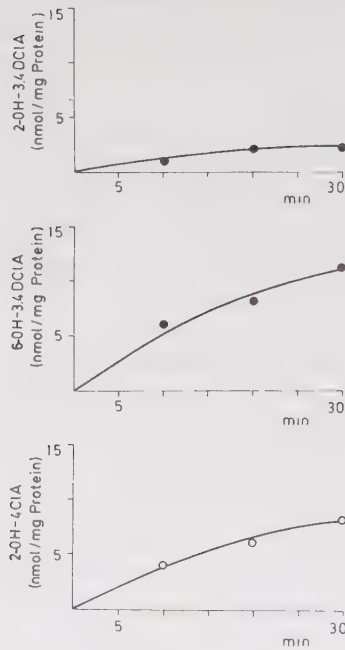


Abb. 30b Ring-Hydroxylierung von 4-Chloranilin und 3,4-Dichloranilin in Mikrosomensuspension

Die Bildung von 2-Hydroxy-4-chloranilin aus 4-Chloranilin (Abb. unten; o) und die von 2-Hydroxy-3,4-dichloranilin (Abb. oben; ●) und 6-Hydroxy-3,4-dichloranilin aus 3,4-Dichloranilin (Abb. mitte; ●) wurde unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 30a untersucht.

4.2. N-Dehydroxylierung von
N-Hydroxy-4-Chloranilin und N-Hydroxy-3.4-Dichloranilin

Arylhydroxylamine, aus Arylaminen durch N-Hydroxylierung von mikrosomalem Cytochrom P-450 gebildet, sind selbst Substrate für reduzierende Enzyme der mikrosomalen Fraktion. Sie werden von ihnen wieder zu den entsprechenden Arylaminen reduziert.

Deshalb wurde auch die N-Dehydroxylierung von NOH-4ClA und NOH-3.4DClA mit Lebermikrosomen von unbehandelten und PB-induzierten Kaninchen untersucht. In den Etherextrakten wurden wie vermutet neben den unveränderten Arylhydroxylaminen die entsprechenden Arylamine gefunden.

In Inkubaten mit Lebermikrosomen von einem unbehandelten und einem PB-behandelten Kaninchen und jeweils 1 mM NOH-4ClA oder NOH-3.4DClA wurden folgende initiale Geschwindigkeiten der 4ClA- und 3.4DClA-Bildung bestimmt:

	<u>4ClA</u>	<u>3.4DClA</u>
unbeh.	6.2	13.7
PB-beh.	17.7	17.4

(Werte in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)

Diesen Ergebnissen wurde die Produktkonzentration nach 5 min Reaktion bei 37°C und einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml zugrundegelegt. Bei Lebermikrosomen von PB-behandelten Kaninchen wurde ein mittlerer Cytochrom P-450-Gehalt (bestimmt nach Omura & Sato, 1964) von 3.12 (± 0.26) nmol/mg Protein, bei unbehandelten Tieren von 1.26 (± 0.17) nmol Cytochrom P-450/mg Protein bestimmt (Mittelwerte aus je 12 Versuchen). Schon nach 5 - 10 min Inkubationszeit wurde der lineare Ast der Anfangsgeschwindigkeit verlassen (s. Abb. 31).

NOH-3.4DClA war für die N-Dehydroxylierung durch Lebermikrosomen

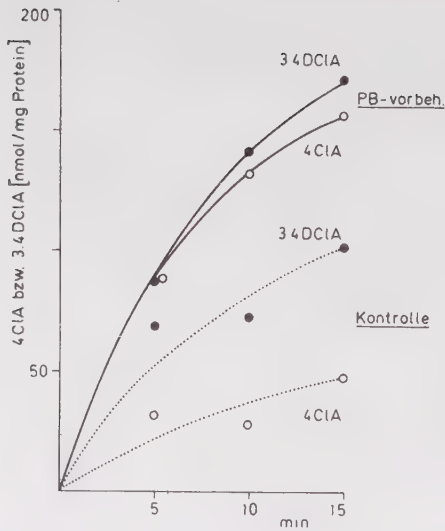


Abb. 31 N-Dehydroxylierung von N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-3,4-dichloranilin in Mikrosomensuspension

N-Hydroxy-4-chloranilin (o) und N-Hydroxy-3,4-dichloranilin (●) (jeweils 1 mM) wurden mit Lebermikrosomen von PB-behandelten Kaninchen (durchgezogene Kurven) und von Kontrolltieren (durchbrochene Kurven), suspendiert in 1/15 M Phosphatpuffer pH 7.4 (1 mg Protein/ml), bei 37°C inkubiert (jeweils ein typisches Experiment).

unbehandelter Kaninchen ein besseres Substrat als NOH-4ClA. PB-Behandlung der Kaninchen erhöhte die Geschwindigkeit der N-Dehydroxylierung beider Arylhydroxylamine durch die Lebermikrosomen, aber in unterschiedlichem Ausmaß: NOH-4ClAA wurde dreimal so schnell und NOH-3.4DClA nur um ein Drittel schneller reduziert.

Durch die PB-Behandlung wurde also nicht nur die durch Cytochrom P-450 katalysierte N-Oxygenierung der Arylamine, sondern auch die N-Dehydroxylierung der Arylhydroxylamine induziert.

Im Verlauf von maximal 60 min Inkubationszeit wurden nach der dünnschicht-chromatographischen Trennung von Ausgangsmaterial und Produkt (in Form ihrer N-Acetyl-Derivate) ca. 72% der eingesetzten Substanzmenge wiedergefunden, 4-17% davon als Arylamin. Die zu Beginn beobachtete schnelle Abnahme von etherextrahierbarem Material deutet auf eine Bindung von reaktiven Molekülspezies an mikrosomales Protein hin.

Anhang: N-Deacylierung von
4-Chlorpropionanilid und 3.4-Dichlorpropionanilid

Mit den folgenden Versuchen sollte die Aktivität mikrosomaler N-Arylamidasen untersucht werden. Als Substrate wurden 4-Chlor- und 3.4-Dichlorpropionanilid gewählt. Der Einfluß des Esterasehemmers Paraoxon auf die Geschwindigkeit der N-Deacylierung wurde in Abhängigkeit von der Konzentration geprüft.

1. Kinetik der Arylamin-Bildung

Setzte man einer Suspension von Lebermikrosomen von Kaninchen, die mit PB behandelt waren, 4ClPA bzw. 3.4DClPA zu, wurde innerhalb von 30 min ein linearer Anstieg der 4ClA- bzw. 3.4DClA-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet.

Man bestimmte bei 37°C in Ansätzen von 1 mM 4ClPA und Kaninchenlebermikrosomen (1 mg Protein pro ml):

2.0 nmol 4ClA/min mg Prot. am Tag der Präparation
1.5 nmol 4ClA/min mg Prot. einen Tag nach der Präparation
0.9 nmol 4ClA/min mg Prot. fünf Tage nach der Präparation
und 5.1 nmol 4ClA/min mg Prot. mit Rattenlebermikrosomen
am Tag der Präparation

In Ansätzen mit 1 mM 3.4DClPA und Kaninchenlebermikrosomen (1 mg Protein pro ml) fand man bei 37°C:

7.5 nmol 3.4DClA/min mg Prot. am Tag der Präparation
3.7 nmol 3.4DClA/min mg Prot. einen Tag nach der Präparation
2.6 nmol 3.4DClA/min mg Prot. fünf Tage nach der Präparation
und 9.8 nmol 3.4DClA/min mg Prot. mit Rattenlebermikrosomen
am Tag der Präparation

Am Tag der Präparation verlief die Arylamin-Bildung am schnellsten. Mit Rattenlebermikrosomen war die Ausbeute an Arylamin deutlich höher als mit Kaninchenlebermikrosomen (beide Präparate von PB-vorbehandelten Tieren). Der Unterschied war mit 4ClPA als Substrat besonders deutlich. Die Alterung der mikrosomalen N-Arylamidasen war mit 3.4DClPA als Substrat deutlicher zu erkennen als mit 4ClPA. Die Abnahme der Aktivität deutete auf eine relativ große Zersetzlichkeit der N-Arylamidasen in der mikrosomalen Fraktion hin. Die Versuche wurden daher einen Tag nach der Präparation durchgeführt, um auch bei großen Versuchsserien unter einheitlichen Bedingungen arbeiten zu können.

2. Abhängigkeit der Arylamin-Bildung von der Substratkonzentration

Zu Suspensionen von Lebermikrosomen PB-behandelter Kaninchen oder Ratten (1 mg mikrosomales Protein/ml) wurden 4ClPA oder 3.4DClPA in Konzentrationen von 0.02 bis 5.12 mM gegeben. Nach 15 min Reaktionszeit bei 37°C wurde die 4ClA- bzw. 3.4DClA-Konzentration nach der Methode von Brodie & Axelrod (1948) bestimmt.

Verfolgte man die Geschwindigkeit der Arylaminbildung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, so beobachtete man bei kleinen Substratkonzentrationen eine lineare Beziehung zwischen initialer Geschwindigkeit und der Substratkonzentration, die für 0.64 mM 4ClPA bzw. 1.28 mM 3.4DClPA bereits eine leichte Abweichung von der Linearität zeigte, um bei noch höheren Substratkonzentrationen auf den horizontalen Ast (maximale Geschwindigkeit) einzubiegen.

4ClPA wurde von Kaninchenlebermikrosomen langsamer N-deacyliert als Propanil. Durch das zweite Chloratom am Benzolring wurde die Affinität zu den mikrosomalen N-Arylamidasen offenbar verstärkt. Mit Rattenlebermikrosomen wurde schnellere N-Deacylierung beider Substrate gemessen: 4ClPA wurde zweieinhalb-, 3.4DClPA eineinhalb-

mal so schnell wie von Kaninchenlebermikrosomen umgesetzt. Wieder wurde 3.4DC1PA noch rascher N-deacyliert als 4ClPA.

Graphische Ermittlung von K_M und V_{Max} nach Lineweaver/Burk lieferte für die N-Deacylierung von 4ClPA und 3.4DC1PA durch Lebermikrosomen von PB-behandelten Kaninchen folgende Ergebnisse:

	<u>4ClPA</u>	<u>3.4DC1PA</u>
app. K_M [μM]	457 $\pm$ 41	3034 $\pm$ 483
app. V_{Max} [$nmol\ min^{-1}\ mg^{-1}$]	3.7 $\pm$ 0.5	21.7 $\pm$ 2.5

($MW \pm S.E.$ von 10 Versuchen)

Ähnliche Ergebnisse erhielt man, als das gebildete Arylamin als N-Acetylderivat quantifiziert wurde. Die Reaktionsmischung wurde nach 30 min mit Ether extrahiert und die 4ClA- bzw. 3.4DC1A-Konzentration nach Reaktion mit Acetanhydrid und dünn-schicht-chromatographischer Trennung anhand der UV-Extinktion am Absorptionsmaximum bestimmt.

3. Arylamin-Bildung in Gegenwart von Paraaxon

aus 4-Chlorpropionanilid:

Suspensionen von Kaninchenlebermikrosomen mit 1 mg Protein/ml wurden mit 0.5 mM 4ClPA und 10^{-9} - $10^{-3}M$ Paraaxon versetzt und bei 37°C inkubiert. Zum Vergleich wurde parallel dazu ein Kontrollansatz ohne Paraaxon durchgeführt.

Nach 30 min wurden in den Etherextrakten die Konzentration des gebildeten 4ClA und die Konzentration des Ausgangsmaterials 4ClPA UV-spektrophotometrisch bestimmt. In Ansätzen mit 10^{-9} , 10^{-8} und $10^{-7} M$ Paraaxon wurde so viel 4ClA bestimmt, wie in Ansätzen ohne

Paraoxon. Von 10^{-6} M an hemmte Paraoxon die 4ClA-Bildung, denn es wurden nur noch 77% der oben genannten Menge 4ClA gefunden. In Ansätzen ab 10^{-5} M Paraoxon konnten nur noch ca 3% dieser 4ClA-Menge gefunden werden.

Von 50 μmol 4ClPA wurden innerhalb von 30 min 5.4 μmol 4ClA (11%), isoliert als 4ClAA, in Abwesenheit von Paraoxon oder in Anwesenheit von 10^{-9} - 10^{-7} M Paraoxon gefunden. In Gegenwart von 10^{-6} M Paraoxon wurden noch 4.2 μmol (8%) gefunden, ab 10^{-5} M Paraoxon nur noch 0.2 μmol (0.3%).

aus 3.4-Dichlorpropionanilid:

Der oben beschriebene Versuch wurde auch mit 0.5 mM Propanil ausgeführt.

In Ansätzen mit 10^{-9} , 10^{-8} und 10^{-7} M Paraoxon wurde ebenfalls so viel 3.4DClA gefunden wie in Abwesenheit von Paraoxon. In einer Konzentration von 10^{-6} M hemmte Paraoxon die 3.4DClA-Bildung zu 27%, denn es wurden nur noch 73% der oben genannten 3.4DClA-Menge gefunden. In Ansätzen ab 10^{-5} M Paraoxon konnten nur noch 2% dieser 3.4DClA-Menge bestimmt werden.

Von 50 μmol 3.4DClPA wurden innerhalb von 30 min 15.4 μmol 3.4DClA (31%), isoliert als 3.4DClAA, in Abwesenheit von Paraoxon oder Anwesenheit von 10^{-9} - 10^{-7} M Paraoxon gefunden. In Gegenwart von 10^{-6} M Paraoxon konnten nur 11.2 μmol (22%) und ab 10^{-5} M Paraoxon nur noch 0.3 μmol (0.6 %) bestimmt werden.

Addierte man die Arylaminmenge zur Konzentration des wiedergefundenen Propionanilids im jeweiligen Ansatz, so wurden 86% der eingesetzten Substanzmenge wiedergefunden.

Die Ergebnisse zeigen, daß Propanil in Suspensionen von Kaninchen-

lebermikrosomen etwa dreimal so schnell N-deacyliert wurde wie 4ClPA. Anwesenheit von 10^{-6} M Paraaxon hemmte diese Reaktionen zu 25%, 10^{-5} M Paraaxon oder noch höhere Konzentrationen hemmten sie praktisch vollständig. Die Blockade der mikrosomalen N-Arylamidasen durch Paraaxon war mit beiden Substraten in gleichem Ausmaß zu beobachten.

DISKUSSION

1. Ferrihämoglobin-Bildung durch aromatische Amine in der Ratte
2. Aktivierung aromatischer Amine in vitro
 - Peroxygenase-Aktivität von Oxyhämoglobin -
- a) Ferrihämoglobin in Erythrozyten und in Hämoglobin-Lösung
- b) Beziehung zwischen Ferrihämoglobin-Bildung und der N- und C-Oxygenierung aromatischer Amine in Erythrozyten
- c) Beziehung zwischen Ferrihämoglobin- und 4-Aminophenol-Bildung aus Anilin in Erythrozyten
- d) Vergleich mit der N- und C-Oxygenierung aromatischer Amine durch mikrosomales Cytochrom P-450
3. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-Derivate aromatischer Amine in der Ratte
4. Ferrihämoglobin-Bildung durch Ring-Hydroxy-Derivate aromatischer Amine in vivo und in vitro
5. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Acyl-Derivate aromatischer Amine in vivo und in vitro
6. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-N-arylacetamide in der Ratte
 - a) Vergleich mit N-Arylacetamiden und Arylhydroxylaminen
 - b) Wirkung von Phosphorsäure-bis(-4-nitrophenylester)
 - c) Metabolite von N-Hydroxy-4-chloracetanilid und N-Hydroxy-4-chloranilin in der Ratte
 - d) Vergleich einer polycyclischen, kanzerogenen mit einer monocyclischen N-Arylaceto-hydroxamsäure
7. Vergleich der Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-N-aryl-acetamide und Arylhydroxylamine im Erythrozyten in vitro

- a) Vergleich mit der Reaktion in Hämoglobin-Lösung
 - b) Wirkung von Paraoxon
 - c) Wirkung von Glucose auf die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid
 - d) Metabolite von N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Erythrozyten
8. Vergleich der Reaktionen von N-Hydroxy-4-chloracetanilid und N-Hydroxy-4-chloranilin in Hämoglobin-Lösung
- a) Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten
 - b) Aktivierungsenergie
 - c) Katalytische Aktivität
 - d) Reaktionsprodukte
9. Mechanismus der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Oxyhämoglobin
10. Die Rolle des Sauerstoffs bei der Reaktion von Hämoglobin mit N-Hydroxy-4-chloracetanilid und N-Hydroxy-4-chloranilin

1. Ferrihämoglobin-Bildung durch aromatische Amine in der Ratte

Die Ferrihämoglobin-bildende Aktivität des Anilins und seiner Derivate, die elektronenziehende (4-Chloranilin, 3.4-Dichloranilin) und elektronenschiebende Substituenten (4-Phenetidin) am Benzolring haben, wurde in der Ratte bestimmt. Die Wirkung dieser monocyclischen Verbindungen wurde verglichen mit der von zwei polycyclischen carcinogenen Arylaminen, 4-Aminobiphenyl und 2-Aminofluoren. Während sich 4-Aminobiphenyl als der stärkste Ferrihämoglobin-Bildner unter den getesteten Verbindungen erwies, war 2-Aminofluoren am schwächsten wirksam (Abb. 1). Eine Beziehung zwischen der Ferrihämoglobin-bildenden Aktivität und den pK_a - Werten der untersuchten Arylamine, die von Zufall (1981) bestimmt wurden, ließ sich nicht herstellen. Die Unterschiede in Wirkungseintritt und -dauer deuten auf unterschiedliche Geschwindigkeit der Resorption und Aktivierung der Arylamine zur aktiven Ferrihämoglobin-bildenden Verbindung und auf unterschiedliche Stabilität des aktiven Metaboliten hin.

2. Aktivierung aromatischer Amine in vitro - Peroxygenase-Aktivität von Oxyhämoglobin

a) Ferrihämoglobin im Erythrozyten und in Hämoglobin-Lösung

Die aromatischen Amine bildeten entgegen der von Uehleke (1972), McLean et al. (1967) und Prankerd (1961; S.140) geäußerten Ansicht auch in vitro in Suspensionen roter Zellen und in Lösungen von gereinigtem Hämoglobin Ferrihämoglobin (Abb. 7 und 18).

Während bisher vor allem die Leber als Ort für die Aktivierung aromatischer Amine in Frage kam, wurde in neueren Arbeiten (Mieyal, et al., 1976; Mieyal & Blumer, 1976) auch eine Aktivierung durch Oxyhämoglobin nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen gezeigt, daß auch Oxyhämoglobin N- und C-Oxygenierungen in der Art einer Monooxygenase-Reaktion bewirken kann, wie

sie von Cytochrom P-450 in der Leber bekannt sind. Die Autoxidation des Hämoglobins wurde sowohl durch Anilin als auch durch 4-Chloranilin beschleunigt. Durch NADPH wurde die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht, und zwar mehr, als die Autoxidation durch NADPH allein beschleunigt wird (Abb. 18). Da Nitrosoarene von NADPH zu Arylhydroxylaminen reduziert werden (Bernheim, 1972) und Arylhydroxylamine eine Hämoglobin-Oxidation bewirken, könnte das Ergebnis ein Hinweis auf die Bildung dieser N-Oxidationsprodukte aus den Arylaminen in Lösungen von gereinigtem Hämoglobin sein.

Mieyal & Blumer (1976) fanden eine beschleunigte Autoxidation von Oxyhämoglobin in Gegenwart von Anilin, jedoch keine 4-Aminophenol-Bildung ohne Reduktase und Kofaktor. Die Hemmung der Reaktion durch Sauerstoff selbst ließ auf eine Kompetition Sauerstoff / Anilin um Oxyhämoglobin schließen. Die Wechselwirkung des Anilins mit Oxyhämoglobin wurde verglichen mit der des allosterischen Effektors 2,3-Diphosphoglycerat, der allerdings im Gegensatz zum Anilin offenbar an reduziertes Hämoglobin und nicht an Oxyhämoglobin bindet (Kompetition Sauerstoff / 2,3-Diphosphoglycerat). Anilin könnte wie 2,3-Diphosphoglycerat durch seine Bindung die Sauerstoff-Affinität des Hämoglobins vermindern und so seine Autoxidation erleichtern.

b) Beziehung zwischen Ferrihämoglobin-Bildung und der N- und C-Oxygenierung aromatischer Amine in Erythrozyten

Alle in der vorliegenden Arbeit in vivo untersuchten Arylamine bildeten auch in Erythrozyten in vitro Ferrihämoglobin. Die Kinetik der Ferrihämoglobin-Bildung zeigte den für eine Autokatalyse typischen sigmoiden Verlauf (Abb. 7), Hinweis auf eine Beschleunigung der Hämoglobin-Oxidation durch N- und Ring-hydroxylierte Derivate, die während der Hämoglobin-Autoxidation aus den Arylaminen gebildet wurden.

Anilin und 4-Phenetidin bildeten sehr langsam Ferrihämoglobin, seine Konzentration in der Erythrozyten-Suspension nahm in Abhängigkeit von der Zeit nur sehr langsam zu. Beide Kinetiken zeigten den für Autokatalyse typischen Verlauf, 4-Phenetidin schwächer als

Anilin. Nach Inkubation mit Anilin wurde 4-Aminophenol, daneben aber auch kleine Mengen der N-Oxydationsprodukte Nitroso- und Nitrobenzol gefunden. Nach Inkubation mit 4-Phenetidin konnte nur Nitrosophenetol nachgewiesen werden, das allerdings auch ohne Hämoglobin entsteht, Ring-Hydroxy-Derivate von 4-Phenetidin wurden nicht entdeckt. Aus der geringen Ferrihämoglobin-Bildung kann geschlossen werden, daß 4-Nitrosophenetol nur langsam zum Arylhydroxylamin reduziert und durch Reaktion mit Glutathion oder anderen SH-haltigen Peptiden verbraucht wird (s. Abb. 10).

Die beiden chlorierten Arylamine reagierten nach einer lag-Phase von einer Stunde sehr schnell mit dem Hämoglobin in Erythrozyten. Die autokatalytische Beschleunigung durch die während der Reaktion mit Oxyhämoglobin gebildeten reaktiven Verbindungen war sehr viel größer als bei Anilin und 4-Phenetidin. Dementsprechend wurden auch höhere Konzentrationen von oxygenierten Metaboliten gefunden, die die gemessenen Ferrihämoglobin-Konzentrationen erklären können. Sowohl N-oxygenierte Derivate als auch o-Aminophenole konnten identifiziert und bestimmt werden. Zusätzlich wurde bei der Reaktion von 3,4-Dichloranilin ein 2-Amino-3H-phenoxazin-3-on isoliert, das durch oxidative Verknüpfung von zwei Molekülen 2-Hydroxy-3,4-dichloranilin oder einem 2-Hydroxy- und einem 6-Hydroxy-3,4-dichloranilin entstanden ist. Auch bei der Reaktion von 4-Chloranilin wurden Spuren eines solchen Folgeprodukts gebildet. Eckert & Eyer (1983) fanden nach der Reaktion von 2-Aminophenol und 2-Hydroxyphenetidin in Hämoglobin-Lösung jeweils das entsprechende 2-Amino-3H-phenoxazin-3-on.

Die hohe Geschwindigkeit der Ferrihämoglobin-Bildung ist korreliert mit der Bildung von N- und Ring-hydroxylierten Produkten, die selbst Hämoglobin oxidieren können. Eine Ursache für die unterschiedliche Ferrihämoglobin-bildenden Aktivität der untersuchten Arylamine wären dann unterschiedliche Bildungsgeschwindigkeiten der Produkte, z.B. durch unterschiedliche Affinität der Substrate zu Oxyhämoglobin. Die unterschiedliche Ferrihämoglobin-bildende Aktivität kann aber auch dadurch bedingt sein, daß je nach Substrat wenig aktive oder stark aktive Metabolite gebildet werden.

Wurden diese N- und Ring-hydroxylierten Derivate der Arylamine auf ihre Fähigkeit getestet, Ferrihämoglobin in Erythrozyten in vitro zu oxidieren, erwiesen sie sich als sehr aktiv (Abb. 10 und 13). Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die gemessenen Konzentrationen der Oxidationsprodukte die beobachteten Ferrihämoglobin-Konzentrationen erklären können. Aufgrund der großen Beschleunigung der Ferrihämoglobin-Bildung durch die beiden chlorierten Arylamine ist anzunehmen, daß aus den N- und Ring-hydroxylierten Verbindungen reaktive Zwischenprodukte (z.B. bei der Phenoxazon-Bildung) entstehen, die die Ferrihämoglobin-Bildung noch zusätzlich beschleunigen.

Blisard & Mieyal (1976) und Tomoda et al. (1976) gelang es, die Bildung von 4-Aminophenol aus Anilin in Erythrozyten und Vollblut nachzuweisen. Ingelmann-Sundberg & Ekström (1982) berichteten, daß bei der 4-Aminophenol-Bildung aus Anilin im rekonstituierten System (mikrosomales Cytochrom P-450) das Hämoprotein durch Hämoglobin ersetzt werden kann. Die Geschwindigkeit der Produktbildung nahm aber um den Faktor 20 ab. Ferraiolo et al. (1982) konnten diese Hämoglobin-Eigenschaft (= Wirkung einer mischfunktionellen Oxygenase) den β -Untereinheiten des Hämoglobins zuordnen. Golly & Hlavica (1983) fanden N-Hydroxylierung von 4-Chloranilin, erwähnen aber nicht das Auftreten von Ring-hydroxylierten Produkten. Der Zusammenhang zwischen der Hämoglobin-Oxidation und der 4-Aminophenol- bzw. N-Hydroxy-4-chloranilin-Bildung wurde in keiner der Arbeiten untersucht.

c) Beziehung zwischen Ferrihämoglobin- und 4-Aminophenol-Bildung aus Anilin in Erythrozyten

Ferrihämoglobin- und 4-Aminophenol-Konzentration nahmen nach Inkubation von Anilin mit Erythrozyten parallel zu, bis ca. 70% des Hämoglobins oxidiert waren (Abb. 9a). Von da ab stieg die Ferrihämoglobin-Konzentration wesentlich langsamer an als zu Beginn der Reaktion. Die 4-Aminophenol-Konzentration nahm sogar ab, allerdings nicht so schnell wie der Zersetzung von 4-Aminophenol in Puffer unter den Versuchsbedingungen entsprochen hätte (Abb. 9b). Das bedeutet, daß die Bildungsgeschwindigkeit des 4-Aminophenols jetzt von der seines Zerfalls übertroffen wurde.

Diese Ergebnisse bestätigen, daß mit zunehmender Ferrihämoglobin-Konzentration die Affinität des restlichen Ferrohämoglobins zum Sauerstoff ansteigt (Darling & Roughton, 1942; Kiese & Schneider, 1955). Die Bereitschaft des Oxyhämoglobins zur Freisetzung von Sauerstoff für eine Substrat-Oxidation und die Geschwindigkeit der Hämoglobin-Oxidation nehmen mit zunehmender Ferrihämoglobin-Konzentration ab. So wird verständlich, daß sowohl Ferrihämoglobin als auch Produkt langsamer gebildet werden.

d) Vergleich mit der N- und C-Oxygenierung aromatischer Amine
durch mikrosomales Cytochrom P-450

Dieselben Produkte, die nach Inkubation von 4-Chloranilin und 3.4-Dichloranilin mit Erythrozyten gefunden wurden, entstanden auch während der Inkubation der Amine mit Lebermikrosomen. Die N- und C-Oxygenierung durch mikrosomales Cytochrom P-450 verlief jedoch sehr viel schneller als durch Hämoglobin in Erythrozyten. Ein exakter Vergleich der beiden Geschwindigkeiten ist nicht möglich, da die initiale Geschwindigkeit der Produktbildung in den Erythrozyten nicht bekannt ist.

Bei der Oxygenierung der Arylamine durch mikrosomales Cytochrom P-450 ist die Bildung der N-Hydroxy-Derivate überlagert von der Rückreaktion. Arylhydroxylamine sind selbst Substrat für mikrosomale Reduktasen. Dies zeigt sich daran, daß die initiale Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung rasch abnimmt (Abb. 29a), weil die Geschwindigkeit der N-Dehydroxylierung zunimmt (Abb. 30). Die Oxygenierung der Arylamine durch Oxyhämoglobin in Erythrozyten verläuft so langsam, daß erst nach ein- bzw. dreieinhalbständiger Inkubationsdauer, wenn die Hauptmenge des Hämoglobins oxidiert ist, die Bestimmung der kleinen Produktkonzentrationen erfolgreich ist. Deshalb können nur die Konzentrationen der resultierenden Produkte am Ende der Reaktionen verglichen werden.

Der Vergleich hat gezeigt, daß die N-Hydroxylierung von 4-Chloranilin durch mikrosomales Cytochrom P-450 5000mal, die von 3.4-Dichloranilin 1000mal schneller ist als durch Oxyhämoglobin in Ery-

throzyten, die Ring-Hydroxylierung der beiden Substrate ist dagegen nur 25 bis 250mal schneller.

Die N- und C-Oxygenierung aromatischer Amine durch Oxyhämoglobin kann nur bei so hohen Arylamin-Konzentrationen beobachtet werden wie sie praktisch in vivo nie entstehen. Sie kann mit der viel schnelleren Fremdstoff - Aktivierung durch mikrosomales Cytochrom P-450 nicht konkurrieren. Daher ist zur Zeit auch ungewiß, ob diese Reaktionen toxikologische Bedeutung haben. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob sehr reaktive Verbindungen, wie z.B. N-Hydroxy-2-aminofluoren/ 2-Nitrosofluoren, nur dann toxische Wirkungen im Erythrozyten zeigen, wenn sie auch dort (d.h. am Wirkort) gebildet werden, oder ob sie auch dann noch wirken, wenn sie in der Leber gebildet werden.

3. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-Derivate aromatischer Amine in der Ratte

Beim Vergleich der Ferrihämoglobin-bildenden Eigenschaften einiger Arylamine, N-Arylacetamide und ihrer N-Hydroxyderivate erwiesen sich die Arylhydroxylamine als die wirksamste Substanzklasse in vivo.

N- und C-Hydroxylierung werden als Prärequisit für die Toxizität aromatischer Amine betrachtet, seit Kiese (1959) die N-Hydroxylierung von Anilin als Voraussetzung für die Ferrihämoglobin-bildende Wirkung (akute Toxizität) und Cramer et al.(1960) die N-Hydroxylierung von 2-Acetylaminofluoren als Voraussetzung für die carcinogene Wirkung (chronische Toxizität) entdeckten. Nach Kiese (1974) kann das eigentlich Ferrihämoglobin-bildenden Agens durch N- oder Ring-Hydroxylierung aromatischer Amine gebildet werden.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß kleinere Dosen der Arylhydroxylamine in der Ratte (Abb. 2) schneller und höhere Konzentrationen Ferrihämoglobin erzeugten als die entsprechenden Arylamine (Abb. 1). Der Einfluß des Aryl-Substituenten am Stickstoffatom auf die Ferrihämoglobin-bildende Aktivität war bei den Aryl-

aminen stärker als bei ihren N-Hydroxy-Derivaten. Es wurde eine andere Reihenfolge der Ferrihämoglobin-bildenden Aktivität der Arylhydroxylamine gefunden als bei den Arylaminen:



Die Wirkungssteigerung durch synthetische N-Hydroxylierung war je nach dem Aryl-Substituenten am Stickstoffatom verschieden. Die N-Hydroxy-Derivate der stärker wirksamen Arylamine 4-Aminobiphenyl, 4-Phenetidin und 4-Chloranilin waren drei-, vier- bzw. siebenmal so stark wirksam, was für eine rasche N-Hydroxylierung in vivo und hohe Verfügbarkeit des aktiven Ferrihämoglobin-bildenden Metaboliten am Wirkort spricht. Bei den schwächer wirksamen Arylaminen hatte die synthetische N-Hydroxylierung einen größeren Effekt auf die Ferrihämoglobin-bildende Aktivität, denn N-Hydroxy-3.4-Dichloranilin war 16- und Phenylhydroxylamin sogar 132-fach stärker wirksam als das entsprechende Arylamin. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, daß die Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung in vivo in der Leber klein ist und Ring-hydroxylierte Metabolite mit geringer Ferrihämoglobin-bildender Wirkung gebildet werden.

Während 2-Aminofluoren etwa gleich stark wirksam ist wie Anilin, unterscheiden sich ihre N-Hydroxy-Derivate in der Ferrihämoglobin-bildenden Aktivität. Phenylhydroxylamin ist 132mal, N-Hydroxy-2-aminofluoren dagegen nur 35mal so aktiv wie das Arylamin.

Uehleke (1962, 1963) untersuchte die Ferrihämoglobin-Bildung nach Injektion von Anilin, 4-Phenetidin, 4-Chloranilin, 4-Aminobiphenyl und 2-Aminofluoren in der Katze und die Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung dieser Verbindungen durch Rattenlebermikrosomen in vitro. Die beiden Studien sind aufgrund unterschiedlicher experimenteller Bedingungen nicht miteinander zu vergleichen. Sie zeigen jedoch ebenso wie die hier vorliegenden Ergebnisse, daß entgegen der Ansicht von Uehleke für die Ferrihämoglobin-bildende Aktivität ei-

nes Arylamins nicht nur die Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung, sondern auch die Konzentration bzw. Stabilität des aktiven Metaboliten am Wirkort von Bedeutung ist.

Der rasche Wirkungseintritt nach vergleichsweise niedrigen Arylhydroxylamin-Dosen stützt die Annahme, daß diese Verbindungen die ultimalen Ferrihämoglobin-Bildner sind oder ihnen zumindest sehr nahe stehen.

4. Ferrihämoglobin-Bildung durch Ring-Hydroxy-Derivate aromatischer Amine in vivo und in vitro

Ferrihämoglobin wird aber in vivo nicht nur durch die N-Hydroxy-Derivate aromatischer Amine gebildet. Kiese et al. (1971) fanden, daß für die Ferrihämoglobin-bildende Aktivität von N,N-Dimethylanilin seine ortho- und para-Hydroxy-Derivate verantwortlich sind.

Die ortho-Hydroxy-Derivate von 4-Chlor- und 3,4-Dichloranilin waren dagegen sehr viel schwächere Ferrihämoglobin-Bildner in vivo als die entsprechenden Arylhydroxylamine. Selbst nach zehnfacher Erhöhung gegenüber der Arylhydroxylamin-Dosis wurden nicht mehr als 2 - 3% Ferrihämoglobin im Blut der Ratte gefunden. Dieses Ergebnis stimmt überein mit einem Bericht von Elson et al. (1948), die die pharmakologischen Eigenschaften von 4-Chloranilin als einem möglichen Metaboliten des Antimalariamittels Paludrin untersuchten. Sie stuften deswegen 2-Hydroxy-4-Chloranilin als einen für die Ferrihämoglobin-Bildung in vivo nicht bedeutenden Metaboliten ein.

Es wird angenommen, daß Konjugation mit Glucuron- oder Schwefelsäure und rasche Eliminierung von Ring-hydroxylierten Metaboliten der aromatischen Amine als effizienter Entgiftungsmechanismus deren schwache Ferrihämoglobin-bildende Aktivität in vivo bedingt.

In Erythrozyten-Suspensionen in vitro bildeten dieselben Verbindungen (Abb. 13) dagegen Ferrihämoglobin nur wenig langsamer als die entsprechenden N-Hydroxy-Derivate (Abb. 10). Auch die geteste-

ten ortho-Aminophenole waren zu einer katalytischen Hämoglobin-Oxidation befähigt, ähnlich wie die Arylhydroxylamine.

5. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Acyl-Derivate
aromatischer Amine in vivo und in vitro

Im Gegensatz zur N-Hydroxylierung verminderte die synthetische N-Acylierung die Ferrihämoglobin-bildende Aktivität der Arylamine in der Ratte um den Faktor zwei bis vier. Die Wirkung setzte langsamer ein, nahm auch langsamer wieder ab als nach Injektion der Arylamine, und es wurden niedrigere maximale Ferrihämoglobin-Konzentrationen gebildet (Abb. 3). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Annahme, daß die Aktivierung von N-Arylacetamiden in zwei Schritten erfolgt: enzymatische N-Deacylierung vor oder nach ihrer N- oder Ring-Hydroxylierung.

In Erythrozyten-Suspensionen wurde nach Zugabe der N-Arylacetamide 4-Chloracetanilid oder 2-Acetylaminofluoren keine Ferrihämoglobin-Bildung beobachtet, was dafür spricht, daß die N-Deacetylierung in Erythrozyten keine Rolle spielt.

6. Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-N-arylacetamide
in der Ratte

a) Vergleich mit N-Arylacetamiden und Arylhydroxylaminen

Die synthetischen N-Hydroxy-Derivate der N-Arylacetamide bildeten in der Ratte wie erwartet in geringeren Dosen schneller und mehr Ferrihämoglobin (Abb. 4) als die N-Arylacetamide selbst (Abb. 3). Sie reagierten jedoch langsamer als die korrespondierenden Arylhydroxylamine (Abb. 2).

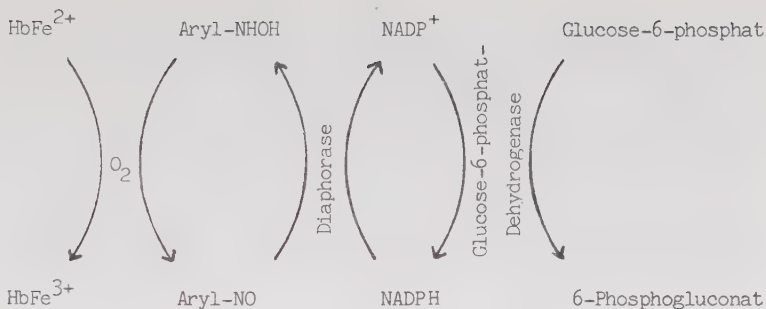
Die Aktivitätssteigerung durch synthetische N-Hydroxylierung war wie bei den Arylaminen unterschiedlich stark ausgeprägt. Die N-Hydroxy-Derivate der stärker wirksamen N-Arylacetamide 4-Chloracetanilid, Phenacetin und 4-Acetylaminobiphenyl waren um den Faktor drei bzw. zwei aktiver. Die stärkste Wirkungssteigerung wur-

de bei der unsubstituierten Verbindung Acetanilid mit dem Faktor 41 beobachtet, während N-Hydroxylierung des genauso schwach wirksamen 2-Acetylaminofluoren die Aktivität nur fünffach gesteigert hat. Es ist bekannt, daß die N-Hydroxylierung von Acetanilid im Gegensatz zu der Ring-Hydroxylierung in vivo sehr langsam ist und deshalb keine Bedeutung hat. Die geringe Wirkungssteigerung durch synthetische N-Hydroxylierung des 2-Acetylaminofluoren dürfte dagegen hauptsächlich mit der geringen Verfügbarkeit des N-hydroxylierten Metaboliten zu erklären sein und muß nicht Ausdruck einer langsamen N-Hydroxylierung in vivo sein.

Bei den N-Arylacetamiden wurde durch synthetische N-Deacetylierung eine zwei- bis vierfach erhöhte Ferrihämoglobin-bildende Aktivität beobachtet. Die Erhöhung der Ferrihämoglobin-bildenden Aktivität durch N-Deacetylierung der N-Arylacetohydroxamsäuren war ebenfalls unterschiedlich. Während durch das Arylhydroxylamin N-Hydroxy-4-chloranilin nur dreimal so schnell Ferrihämoglobin gebildet wurde wie durch die entsprechende Hydroxamsäure, waren N-Hydroxy-4-aminobiphenyl fünf-, N-Hydroxy-3.4-dichloranilin und N-Hydroxy-4-phenetidin sechs-, Phenylhydroxylamin sieben-, und N-Hydroxy-2-aminofluoren sogar vierzehnfach stärkere Ferrihämoglobin-Bildner als die entsprechenden Hydroxamsäuren.

Hustedt und Kiese (1959) und Kiese und Plattig (1959) postulierten aufgrund ihrer Versuche mit N-Acetyl- und N-Benzoylphenylhydroxylamin in vivo und in vitro, daß der Cyclus der Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-N-arylacetamide erst nach enzymatischer Hydrolyse in Gang gesetzt wird.

Für den Mechanismus der Ferrihämoglobin-Bildung durch Arylhydroxylamine wurde folgendes Reaktionsschema vorgeschlagen:



(Kiese, 1974)

Durch metabolische Reaktivierung des bei der gekoppelten Oxidation entstehenden Nitrosoarens können viele Äquivalente Hämoglobin-Eisen(II) pro Arylhydroxylamin oxidiert werden. So wird auch verständlich, daß N-Arylacetohydroxamsäuren langsamer mit Hämoglobin *in vivo* reagieren, wenn sie durch enzymatischen N-Deacetylierung erst zur wirksamen Verbindung aktiviert werden müssen.

Heubner et al. (1953) postulierten dagegen einen radikalischen Mechanismus für die Ferrihämoglobin-Bildung durch Arylhydroxylamine und wollten durch Versuche mit N-Acylarylhydroxylaminen, bei denen eine Oxidation zum Nitrosoaren durch die Acylgruppe am Stickstoff nicht mehr möglich ist, ihre Hypothese beweisen.

Lenk & Scharmer (1980) bestimmten die Geschwindigkeit der enzymatischen N-Deacetylierung von N-Arylacetohydroxamsäuren durch Rattenlebermikrosomen und überstand in vitro und fanden eine andere Reihenfolge, als bei der Ferrihämoglobin-bildenden Aktivität in den vorgelegten in-vivo-Versuchen ermittelt wurde.

Durch Vergleich der Reaktionen von N-Arylacetohydroxamsäuren und Arylhydroxylaminen in vivo und in vitro mit Erythrozyten und gereinigtem Hämoglobin wurde deshalb geprüft, ob die enzymatische Hydrolyse des Säurerestes Vorbedingung für die Hämoglobin-Oxidation war oder ob N-Arylacetohydroxamsäuren durch einen ganz anderen Mechanismus

nismus die Beschleunigung der Hämoglobin-Autoxidation bewirken.

b) Wirkung von Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester)

Durch Versuche mit dem Esterase-Inhibitor Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) sollte geprüft werden, ob durch eine Blockade der mikrosomalen Esterasen auch die Kinetik der Ferrihämoglobin-Bildung beeinflußt wird.

Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester), ein spezifischer Hemmstoff der mikrosomalen Carboxylesterasen, blockiert die Acetylcholinesterase der Erythrozyten nicht und ist weniger toxisch als z.B. Paraoxon (Heymann & Krisch, 1967). Heymann et al. (1969) beobachteten eine stärkere Wirkung von Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) auf die Ferrihämoglobin-Bildung durch Acetanilid in Ratten als auf die durch Phenacetin, und schlossen daraus, daß möglicherweise noch andere, gegenüber Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) weniger empfindliche Arylamidasen in der Leber oder im Plasma an der Aktivierung von Phenacetin beteiligt sind.

Weder die Ferrihämoglobin-Bildung (Abb. 5) noch die Nitroso-4-chlorbenzol-Konzentration nach Injektion der Hydroxamsäure N-Hydroxy-4-chloracetanilid ließen sich durch vorherige Injektion von Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) signifikant beeinflussen. Da zudem nach Injektion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid die gleiche Beziehung zwischen Nitroso-4-chlorbenzol-Konzentration und Ferrihämoglobin im Blut gefunden wurde wie nach Injektion von N-Hydroxy-4-chloranilin (Abb. 6), sind bei der Ferrihämoglobin-Bildung durch die Hydroxamsäure in vivo entweder gegenüber Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) nicht sensitive Arylamidasen an der Aktivierung beteiligt oder es liegt ein anderer Mechanismus der Ferrihämoglobin-Bildung vor.

Die fehlende Wirkung des Esterasehemmstoffes Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester) auf die Kinetik der N-Hydroxy-4-chloracetanilid-induzierten Ferrihämoglobin-Bildung könnte durch den von Heubner et

al. (1953) vorgeschlagenen radikalischen Mechanismus erklärt werden. Das Auftreten von Nitroso-4-chlorbenzol könnte dann nicht nur durch enzymatische Hydrolyse der Hydroxamsäure, sondern auch durch die Dismutation des entstandenen N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxidradikals erklärt werden (s. Schema 1). Aus den hier vorgelegten Ergebnissen kann nicht entschieden werden, welchen Anteil diese beiden Reaktionswege bei der Bildung von N-Hydroxy-4-chloranilin und Ferrihämoglobin durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid in vivo haben, weil der Anteil, den die Leber bildet, nicht bekannt ist.

c) Metabolite von N-Hydroxy-4-chloracetanilid und
N-Hydroxy-4-chloranilin in der Ratte

Durch Injektion unterschiedlicher Dosen N-Hydroxy-4-chloracetanilid bzw. N-Hydroxy-4-chloranilin wurden die gleichen Ferrihämoglobin-Konzentrationen im Blut der Ratte erzeugt. Die Konzentration des vermutlichen aktiven Ferrihämoglobin-bildenden Metaboliten N-Hydroxy-4-chloranilin / Nitroso-4-chlorbenzol (immer als Summe gemeinsam bestimmt, da der Wechsel der Oxidationsstufe leicht erfolgt und am Mechanismus der Ferrihämoglobin-Bildung beteiligt ist) war in Abhängigkeit von der beobachteten Wirkung jeweils gleich, unabhängig von der verabreichten Substanz. Daneben wurden 4-Chloranilin, 4-Chloracetanilid und Nitro-4-chlorbenzol in kleinen Mengen im Blut der Ratte gefunden. Nach Injektion der Hydroxamsäure N-Hydroxy-4-chloracetanilid wurde der größte Teil der injizierten Verbindung unverändert wiedergefunden. 3 min nach der Injektion wurde eine höhere Konzentration des aktiven Ferrihämoglobin-bildenden Metaboliten N-Hydroxy-4-chloranilin / Nitroso-4-chlorbenzol gefunden als nach 4 min, als nach Injektion der doppelten Dosis N-Hydroxy-4-chloracetanilid zwar doppelt so hohe Konzentrationen von 4-Chloranilin, 4-Chloracetanilid und Nitro-4-chlorbenzol gefunden wurden, die Konzentration von Nitroso-4-chlorbenzol jedoch nicht proportional zunahm, ein Hinweis, daß dieser reaktive Metabolit rasch aus dem Blut verschwindet.

d) Vergleich einer polycyclischen, kanzerogenen mit einer monocyclischen N-Arylacetoxyhydroxamsäure

Während nach Injektion von 100 mg N-Hydroxy-4-chloracetanilid in der Ratte sowohl rascher Wirkungseintritt (Ferrihämoglobin-Bildung) als auch schneller Anstieg der Konzentrationen von Ausgangsverbindung und Metaboliten zu beobachten war, wurden nach Applikation der gleichen Dosis N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren erst nach 60 bis 90 min eine viel schwächere Wirkung und 50mal niedrigere Konzentration der Ausgangsverbindung gefunden. Die Konzentrationen der Arylamine (4-Chloranilin, 2-Aminofluoren) und der N-Arylacetamide (4-Chloracetanilid, 2-Acetylaminofluoren) war nach 4 bzw. 90 min ungefähr gleich, die Konzentration der Summe von 2-Nitroso- und 2-Nitrofluoren lag etwas höher als die von Nitroso- und Nitro-4-chlorbenzol, was aber trotzdem mit den jeweiligen Ferrihämoglobin-Konzentrationen zu vereinbaren ist, da N-Hydroxy-2-aminofluoren und 2-Nitrosofluoren schwache Ferrihämoglobin-Bildner sind (Abb. 2, bzw. Lenk, unveröffentlicht).

Der langsame Wirkungseintritt nach Injektion von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren spricht für eine langsame Mobilisierung dieser Verbindung aus der Bauchhöhle, im Gegensatz zu N-Hydroxy-4-chloranilin, das über die Lymphgefäße rasch in die Blutbahn gelangt (Betendorf, 1979) und rasch metabolisiert wird. Dieses Ergebnis läßt unterschiedliche Löslichkeit in Körperflüssigkeiten vermuten, was durch die unterschiedliche Wasserlöslichkeit der mono- und der polycyclischen Hydroxamsäure (87:1) bestätigt wird. Auch Weisburger et al. (1969) berichteten über langsame Mobilisierung von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren aus der Bauchhöhle.

Auch in Suspensionen roter Zellen wurden große Unterschiede in der Reaktivität der mono- und der polycyclischen Hydroxamsäure beobachtet (Abb. 14). Erst die 400fache Konzentration von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren bewirkte eine ähnliche Geschwindigkeit der Ferrihämoglobin-Bildung wie N-Hydroxy-4-chloracetanilid. Nach der Reaktion von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren wurde genauso viel unveränderte Hydroxamsäure, aber nur jeweils ein Zehntel der Metabo-

liten-Konzentrationen gefunden wie nach Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid. Ein solch großer Unterschied wurde in Lösungen gereinigten Hämoglobins nicht mehr beobachtet (Abb. 28). Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren mit Hämoglobin war nur noch um die Hälfte kleiner als die der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid. Nach der Reaktion von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren wurde zwar die drei- bis fünffache Menge N-Arylacetamid, aber weniger Ausgangsverbindung im Etherextrakt gefunden, denn die polycyclische Hydroxamsäure wird in höherem Ausmaß an Hämoglobin gebunden (Weisburger et al., 1966) als N-Hydroxy-4-chloracetanilid. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß Diffusion durch bzw. Reaktion mit der Erythrozytenmembran oder Reaktionen mit SH-haltigen Peptiden im Erythrozyten Ursachen für die schwache Ferrihämoglobin-bildende Aktivität von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren sind.

7. Vergleich der Reaktionen von N-Arylacetohydroxamsäuren und Arylhydroxylaminen im Erythrozyten in vitro

a) Vergleich mit der Reaktion in Hämoglobin-Lösung

Die N-Arylacetohydroxamsäuren N-Hydroxyacetanilid, N-Hydroxy-4-chloracetanilid, N-Hydroxy-3,4-dichloracetanilid, N-Hydroxyphenacetin, N-Hydroxy-4-acetylaminobiphenyl und N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren bildeten Ferrihämoglobin auch in Erythrozyten in vitro, und zwar mehr als die stöchiometrische Menge. Die katalytische Aktivität betrug 12 bis 54 mol Ferrihämoglobin pro mol Hydroxamsäure, abhängig vom Substituenten. Die entsprechenden N-deacetylierten Verbindungen reagierten viel schneller mit Hämoglobin und übertrafen die Hydroxamsäuren in ihrer katalytischen Aktivität 10- bis 30mal (Abb. 10). Die polycyclische Hydroxamsäure N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren reagierte sogar über 700mal langsamer als das entsprechende Arylhydroxylamin. Eine Ausnahme bildeten nur die 4-Ethoxy-substituierten Verbindungen, denn die Hydroxamsäure hatte eine höhere katalytische Aktivität als das Arylhydroxylamin. Das durch die Co-Oxidation entstehende 4-Nitrosophenetol wird entweder sehr langsam zu N-Hydroxy-4-phenetidin reduziert oder reagiert bevorzugt mit SH-haltigen Peptiden.

Während große Unterschiede in der Ferrihämoglobin-bildenden Aktivität der einzelnen N-Arylacetoxyhydroxamsäuren in Erythrozytensuspensionen beobachtet wurden, war ihre Aktivität in Lösungen von gereinigtem Hämoglobin nur wenig verschieden. Die Geschwindigkeitskonstante für die langsamste Reaktion (N-Hydroxyacetanilid) unterschied sich von der für die schnellste Reaktion (N-Hydroxy-3.4-dichloracetanilid) um den Faktor zehn. Die besonders schwache Ferrihämoglobin-bildende Aktivität von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren und die viel schnellere Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Erythrozyten in vitro wurde bei Versuchen mit gereinigtem Hämoglobin nicht beobachtet. In Lösungen von gereinigtem Hämoglobin hatte die Geschwindigkeit der Ferrihämoglobin-Bildung folgende Reihenfolge (s. Abb. 28):

NOH-3,4DCIAA > NOH-4AABI > NOH-4CIAA > NOH-2AAF > NOH-4EAA > NOH-AA

Vergleich dieses Ergebnisses mit der Reihenfolge in Erythrozyten-Suspensionen (s. Abb. 14)

NOH-4CIAA >> NOH-3,4DCIAA > NOH-4AABI > NOH-AA > NOH-4EAA >> NOH-2AAF

zeigt, daß Reaktionen mit der Erythrozytenmembran oder Inaktivierungsreaktionen im Erythrozyten, wie z.B. Reaktion mit Glutathion oder anderen SH-haltigen Peptiden, die Verfügbarkeit für die Reaktion mit Oxyhämoglobin beeinflussen können.

b) Wirkung von Paraoxon

Ein weiterer Hinweis darauf, daß N-Arylacetoxyhydroxamsäuren zumindest in vitro Hämoglobin nach einem anderen Mechanismus oxidieren als die entsprechenden Arylhydroxylamine, wurde bei Versuchen mit dem Esteraseinhibitor Paraoxon erhalten. Obwohl die Aktivität der Acetylcholinesterase in Gegenwart von Paraoxon um 70% abnahm, wurde die Geschwindigkeit der Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid nicht beeinträchtigt. N-Hydroxy-4-chloracetanilid bewirkte keine Reaktivierung der durch Paraoxon blockierten Acetylcholinesterase, wie das z.B. von den Aldoximen Pralidoxim oder

Obidoxim (Toxogonin^R) bekannt ist, trotz einer strukturellen Ähnlichkeit der funktionellen Gruppen der beiden Stoffklassen.

Während die Ferrihämoglobin-Bildung selbst durch hohe Paraoxon-Konzentrationen (bis 10^{-2} M geprüft) kaum beeinflusst wurde, wurde in Rindererythrozyten in Gegenwart von 10^{-3} M Paraoxon weniger 4-Chloranilin gebildet als ohne Zusatz von Esterasehemmer. Dieses Ergebnis kann bedeuten, daß durch eine Hemmung der Esteraseaktivität weniger N-Hydroxy-4-chloranilin für eine Weiterreduktion zum Amin zur Verfügung stand. Bei diesen hohen Paraoxon-Konzentrationen ist allerdings auch eine unspezifische Wirkung des Organophosphorsäureesters auf die Reduktasen oder andere Enzyme des Pentose-Phosphat-Wegs denkbar, die für die Reduktion von Nitroso-4-chlorbenzol verantwortlich sind, das auf oxidativem Weg aus N-Hydroxy-4-chloracetanilid gebildet worden ist.

Die Acetylcholinesterase-Aktivität der Erythrozytenmembran hat demnach keine Bedeutung für die N-Hydroxy-4-chloracetanilid - induzierte Ferrihämoglobin-Bildung. Die Bildung von N-Hydroxy-4-chloranilin durch Paraoxon - insensitive Esterasen (LaDu & Snady, 1971) ist aber nicht auszuschließen, doch ist unwahrscheinlich, daß N-Hydroxy-4-chloranilin nur durch diese Esterasen gebildet wird. Eine Hemmung der Acetylcholinesterase-Aktivität um 70% sollte zumindest einen schwachen Effekt auch auf die Ferrihämoglobin-Bildung zeigen, wenn esteratische Spaltung der N-Arylaceto-hydroxamsäure zum Arylhydroxylamin Vorbedingung für die Ferrihämoglobin-Bildung ist.

c) Wirkung von Glucose auf die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Kiese et al.(1950) haben gezeigt, daß das bei der gekoppelten Oxidation von Hämoglobin und Phenylhydroxylamin entstehende Nitrosobenzol in Gegenwart von Glucose im Erythrozyten immer wieder zu Phenylhydroxylamin reduziert wird und so viele Äquivalente Ferrihämoglobin bilden kann. Durch den Abbau der Glucose über den Pentose-Phosphat-Weg werden reduzierende Äquivalente gebildet und durch

NADPH-abhängige Diaphorasen übertragen. Lactat oder Malat, d.h. NADH-abhängige Diaphorasen können diese Reduktion nicht katalysieren. Kiese et al. (1957a,b) fanden, daß diese NADPH-abhängigen Diaphorasen identisch sind mit den Ferrihämoglobin-Reduktasen. Ihre Eigenschaften wurden von Scott et al. (1965) beschrieben.

So wird verständlich, daß N-Hydroxy-4-chloranilin in Rindererythrozyten in vitro in Gegenwart von Glucose bis zu 1000 Äquivalente zweiwertiges Hämoglobin-Eisen oxidieren kann. Die NADH-abhängigen Reduktasen können dagegen die katalytische Wirkung nicht beeinflussen, wie die Versuche mit Lactat gezeigt haben. In Gegenwart von Lactat wird in Rindererythrozyten anscheinend weniger Ferrihämoglobin gebildet als in Rindererythrozyten ohne Zusätze (Abb. 12). In beiden Fällen konnte katalytische Aktivität beobachtet werden, weil endogene Substrate des Glycolyse-Stoffwechsels im Erythrozyten gespeichert sind, die erst durch mehrstündige Inkubation verbraucht werden (Uehleke, 1973).

In Rattenerythrozyten kann die Ferrihämoglobin-Bildung nicht in gleichem Maße durch Zusatz von Glucose stimuliert werden wie in Rindererythrozyten. In Rattenerythrozyten wird nur doppelt so viel Ferrihämoglobin gebildet, im Gegensatz zur fünffachen Menge Ferrihämoglobin in Rindererythrozyten in Anwesenheit von Glucose. Zusatz von Lactat hemmt scheinbar wieder die katalytische Aktivität.

Diese scheinbare Hemmung der Ferrihämoglobin-Bildung durch Zusatz von Lactat kann durch verstärkte Methämoglobin - Reduktion erklärt werden. Da dieser Effekt von Lactat bei Versuchen mit Rattenerythrozyten deutlicher zu beobachten war als mit Rindererythrozyten, ergibt sich hierbei Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Matthies (1957), daß bei der Ratte eine größere Ferrihämoglobin-reduzierende Aktivität in Gegenwart von Lactat gefunden wurde als beim Rind.

Berücksichtigt man, daß in Rattenerythrozyten ohne Zusatz oder in

Gegenwart von Lactat etwa die gleiche Ferrihämoglobin-Konzentration gebildet wird wie in Rindererythrozyten, daß aber in Rindererythrozyten in Gegenwart von Glucose 4-5mal so viel Ferrihämoglobin entsteht wie in Rattenerythrozyten unter den gleichen Bedingungen, so wäre denkbar, daß die für die Reaktivierung von Nitroso-4-chlorbenzol verantwortlichen NADPH-abhängigen Diaphorasen der Rindererythrozyten eine größere Affinität zu Nitroso-4-chlorbenzol besitzen als die der Rattenerythrozyten. Kiese (1963a; 1963b) fand, daß nach Injektion von 4-Chloranilin im Hund Nitroso-4-chlorbenzol kumuliert und weniger Ferrihämoglobin entsteht als durch Nitroso-4-chlorbenzol nach Injektion von Anilin. Versuche mit Erythrozyten *in vitro* haben gezeigt, daß Nitrosobenzol und Nitroso-4-chlorbenzol in Rindererythrozyten ungefähr gleich schnell reduziert werden, während die Reduktion des Nitroso-4-chlorbenzol in Hundeerythrozyten sehr viel langsamer abläuft, Nitroso-4-chlorbenzol daher kumuliert und deswegen sehr viel weniger Ferrihämoglobin gebildet wird.

Demnach könnten Speziesunterschiede in der Geschwindigkeit der Reduktion von Nitroso-4-chlorbenzol für diesen Unterschied verantwortlich sein, aber auch unterschiedliche Affinität von Nitroso-4-chlorbenzol zu Ratten- und Rinderhämoglobin, d.h. Nitroso-4-chlorbenzol wird an die freien Cystein-SH-Gruppen des Hämoglobins oder an Glutathion gebunden statt reduziert. Zu bedenken ist dabei, daß Rattenhämoglobin vier freie SH-Gruppen, Rinderhämoglobin aber nur zwei hat (Antonini & Brunori, 1971).

Im Gegensatz zu der Reaktion des Arylhydroxylamins N-Hydroxy-4-chloranilin war die Ferrihämoglobin-Bildung durch die N-acetylierte Verbindung N-Hydroxy-4-chloracetanilid durch Zusatz von Glucose zu Rindererythrozyten praktisch überhaupt nicht und zu Rattenerythrozyten nur wenig zu steigern (Abb. 15). Lactat hemmte in Rattenerythrozyten wieder die Ferrihämoglobin-Bildung, vermutlich durch stimulierte Ferrihämoglobin - Reduktion. Die zwar schwache, aber deutliche Steigerung der Ferrihämoglobin-bildenden Aktivität durch Glucose in Rattenerythrozyten kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht erklärt werden. Die Vermutung, daß in Rattenerythro-

zyten sehr viel höhere Nitroso-4-chlorbenzol-Konzentrationen entstehen als in Rindererythrozyten konnte nicht bewiesen werden und wird eher unwahrscheinlich durch den Befund, daß N-Hydroxy-4-chloranilin in Rattener erythrozyten viel schwächer durch Glucose zu regenerieren ist als in Rinder erythrozyten.

d) Metabolite von N-Hydroxy-4-chloranilin und
N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Erythrozyten

Nach der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Erythrozyten wurde neben Ausgangsmaterial das Oxidationsprodukt Nitro-4-chlorbenzol und das formale Reduktionsprodukt 4-Chloranilin gefunden.

Zunächst erstaunt, daß bei der gekoppelten Oxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin und Hämoglobin scheinbar auch ein Reduktionsprodukt entsteht. Schon Bamberger (1900) hat beobachtet, daß bei der Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin unter bestimmten Bedingungen auch Nitro-4-chlorbenzol und kleine Mengen 4-Chloranilin entstehen. Doch wird 4-Chloranilin, abgesehen von der schnellen Bildung kleiner Konzentrationen zu Beginn der Reaktion, vor allem aus Nitroso-4-chlorbenzol durch die Diaphorasen des Erythrozyten (Haan et al., 1959; Kiese & Wiedemann, 1968) und über die Reaktion mit Glutathion gebildet. Die reduktive Spaltung des Glutathionsulfinanilids erfolgt durch eine NADPH-abhängige Diaphorase (Eyer & Lierheimer, 1980).

Wurde statt des Arylhydroxylamins Nitroso-4-chlorbenzol zugesetzt, so war das Produktmuster ähnlich. Es entstand lediglich weniger Arylamin.

Von der eingesetzten Substanzmenge N-Hydroxy-4-chloranilin bzw. Nitroso-4-chlorbenzol wurden bereits nach 2 min nur noch je 40% wiedergefunden, nach 67 min sogar nur noch 20 bzw. 22%. Eyer & Lierheimer (1980) fanden nach 30 min Inkubation von radioaktiv markiertem Nitrosobenzol mit Hämoglobin 22% Radioaktivität im Ether. Das bedeutet, daß die nach Versuchen mit N-Hydroxy-4-chloranilin

oder N-Hydroxy-4-chloracetanilid aus Blut oder Erythrozyten bestimmten Nitroso-4-chlorbenzol-Konzentrationen sehr viel niedriger sind als die ursprünglich gebildeten. Eine Korrektur ist dennoch schwierig, da Wiederfindungsexperimente nicht simuliert werden können. Neben der Bindung an Hämoglobin-Eisen(II), aus der Nitroso-4-chlorbenzol bei der verwendeten Aufarbeitungsmethode durch Oxidation des Fe(II) zu Fe(III) mit Kaliumferricyanid freigesetzt und damit etherextrahierbar wird, spielen auch noch andere Bindungsstellen am Protein eine Rolle, v.a. die SH-Gruppen des Hämoglobins (Kiese & Taeger, 1976). Die negative Massenbilanz in den hier beschriebenen Versuchen wird durch Reaktion mit anderen SH-Enzymen, Membranbestandteilen der Erythrozyten und mit Glutathion erhöht (Eyer, 1979a; 1979b; Eyer & Lierheimer, 1980; Lotlikar et al., 1965).

Nach der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Erythrozyten in vitro wurde als Hauptmetabolit 4-Chloracetanilid, das formale Reduktionsprodukt, gefunden. Seine Konzentration stieg mit zunehmender Ferrihämoglobin-Bildung an, genauso wie die Konzentration von 4-Chloranilin und Nitroso-4-chlorbenzol (unter Berücksichtigung der negativen Massenbilanz, s. oben). Nitro-4-chlorbenzol wurde nur in sehr kleinen, konstanten Konzentrationen gefunden. Kontrollversuche sprechen dafür, daß diese Verbindung durch Autoxidation von Nitroso-4-chlorbenzol entstanden sein könnte.

Es wurden also die gleichen Produkte wie nach der Reaktion der Hydroxamsäure mit Oxyhämoglobin in vivo gefunden. Die Metaboliten-Konzentrationen waren sehr klein (max. 7% der eingesetzten Menge), verglichen mit der hohen Wirkung von N-Hydroxy-4-chloracetanilid. Die Summe der Konzentrationen von Nitroso- und Nitro-4-chlorbenzol konnte selbst unter Berücksichtigung der Verlustbestimmung dieser Verbindungen nur maximal ein Drittel der Ferrihämoglobin-Konzentration erklären, was ein weiterer Beweis dafür ist, daß der Mechanismus der Ferrihämoglobin-Bildung von dem des Arylhydroxylamins verschieden ist. Weder ein Verbrauch der Substrate für die Glycolyse durch mehrstündige Vorinkubation noch exogen zugesetzte Glucose hatte Einfluß auf das Produktmuster, endogenes Substrat ist demnach

für die Bildung der Produkte nicht notwendig.

8. Vergleich der Reaktionen von N-Hydroxy-4-chloracetanilid und N-Hydroxy-4-chloranilin in Hämoglobin-Lösung

Die Reaktionen der N-Arylaceto-hydroxamsäure N-Hydroxy-4-chlor-acetanilid und des Arylhydroxylamins N-Hydroxy-4-chloranilin wurden auch in Lösungen gereinigten Hämoglobins untersucht, wo keine enzymatische Hydrolyse, keine enzymatische Reduktion und keine Reaktion mit Glutathion mehr möglich ist.

a) Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten

Das Arylhydroxylamin N-Hydroxy-4-chloranilin reagierte über 2000-mal schneller mit gereinigtem Human-Hämoglobin als die N-Arylaceto-hydroxamsäure N-Hydroxy-4-chloracetanilid. Die Geschwindigkeit bei-der Reaktionen war abhängig von den Konzentrationen der beiden Re-aktionspartner (Abb. 20 und 23), woraus auf ein Zeitgesetz 2.Ordnung geschlossen wurde. Für die Geschwindigkeitskonstante des 4-Chlor-substituierten Phenylhydroxylamins wurde ein ungefähr 3mal so hoher Wert erhalten ($7840 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$), wie ihn Eyer et al. (1975) für die Reaktion der unsubstituierten Verbindung mit Oxyhä-moglobin angegeben haben ($2350 \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$).

b) Aktivierungsenergie

Die Aktivierungsenergie für die sehr schnelle Reaktion des Aryl-hydroxylamins N-Hydroxy-4-chloranilin war niedriger (3.5 kcal/mol) als die der sehr viel langsameren Reaktion der Hydroxamsäure N-Hy-droxy-4-chloracetanilid mit Hämoglobin (12.7 kcal/mol). Die letzte-re kann durch Erhöhung der Temperatur deutlicher beschleunigt wer-den.

Beide Reaktionen zeigen demnach unterschiedliche kinetische Ei-genschaften, eine weiterer Hinweis auf unterschiedliche Reaktions-mechanismen.

c) Katalytische Aktivität

Äquimolare Mengen N-Hydroxy-4-chloranilin reagierten sehr schnell mit Oxyhämoglobin unter Bildung der knapp stöchiometrischen Menge Ferrihämoglobin. Nach Oxidation von 60-70% des Hämoglobins wurde die Reaktionsgeschwindigkeit sehr viel langsamer. Kiese & Schneider (1955) fanden, daß mit zunehmender Ferrihämoglobin-Konzentration in einer Hämoglobin-Lösung die Affinität des verbliebenen Ferrohämoglobin zum Sauerstoff zunimmt. So wird der gebundene Sauerstoff immer weniger leicht abgegeben. Damit könnte erklärt werden, warum die anfangs so große Ferrihämoglobin-Bildungsgeschwindigkeit nach Oxidation von 0.6 - 0.7 Äquivalenten ein Plateau erreicht und nur noch langsam weiter ansteigt, anstatt sofort 100% Ferrihämoglobin zu bilden. Das restliche Arylhydroxylamin wird in dieser schnellen Phase der Co-Oxidation auch vom gelösten Sauerstoff zu Nitroso-4-chlorbenzol oxidiert und dadurch einer Reaktion mit Oxyhämoglobin entzogen. Abb. 20 zeigt die biphasische Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Oxyhämoglobin. Nach Zugabe von weniger als der stöchiometrischen N-Hydroxy-4-chloranilin-Konzentration zu Oxyhämoglobin-Lösungen war am Ende der schnellen Reaktionsphase jeweils ein Äquivalent Hämoglobin-Eisen(II) oxidiert. Die sich daran anschließende langsame Ferrihämoglobin-Bildung, die bis zur Bildung von maximal drei Äquivalenten Ferrihämoglobin pro Arylhydroxylamin führte, wird nicht als schwache katalytische Aktivität des N-Hydroxy-4-chloranilin gedeutet, sondern als viel langsamere Oxidation des Ferrohämoglobin durch Nitroso-4-chlorbenzol. Bei der schnellen Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Oxyhämoglobin entsteht momentan Ferrihämoglobin und Nitroso-4-chlorbenzol, das mit überschüssigem Ferrohämoglobin einen Nitrosoaren - Hämoglobin - Komplex bildet. Wie die Versuche mit Oxyhämoglobin und Nitroso-4-chlorbenzol gezeigt haben, findet auch hier ein Elektronentransfer von Ferrohämoglobin auf Nitroso-4-chlorbenzol und molekularen Sauerstoff (Warburg et al., 1931; Keilin & Hartree, 1943) statt, denn nur ein Teil des Nitroso-4-chlorbenzols wird zu 4-Chloranilin reduziert.

Wurden stöchiometrische Mengen N-Hydroxy-4-chloracetanilid zuge-

setzt, so wurde Hämoglobin im Vergleich zur Reaktion mit N-Hydroxy-4-chloranilin langsamer, aber vollständig oxidiert. Kleinere Hydroxamsäure-Konzentrationen oxidierten sogar mehr als nur die stöchiometrische Menge Ferrohämoglobin (bis zu 45 Äquivalenten; Abb. 24). Das bedeutet, daß die Hydroxamsäure im Gegensatz zum Arylhydroxylamin sogar in Lösungen gereinigten Hämoglobins zu einer Katalyse der Hämoglobin-Oxidation und damit zu einer nicht-enzymatischen Regenerierung des aktiven Ferrihämoglobin-bildenden Agens fähig ist.

d) Reaktionsprodukte

Die gleichen Produkte wie nach Umsetzung der N-Arylaceto-hydroxamsäure in vivo und mit Erythrozyten in vitro wurden auch nach Reaktion mit gereinigtem Hämoglobin gefunden. Die Hauptmenge war unveränderte Hydroxamsäure N-Hydroxy-4-chloracetanilid, daneben wurden mit steigender Ferrihämoglobin-Konzentration zunehmende Mengen des formalen Reduktionsprodukts 4-Chloracetanilid und außerdem Nitroso-4-chlorbenzol gefunden. Berücksichtigt man die hohen Verluste des Nitrosoarens, wofür die Wiedergewinnung von nur 20% ein Maß ist, so kann man auch zwischen Ferrihämoglobin- und Nitroso-4-chlorbenzol-Bildung eine Beziehung herstellen. Die Nitro-4-chlorbenzol-Konzentrationen waren höher als bei Versuchen mit Erythrozyten und betrugen mehr als 10% der Nitroso-4-chlorbenzol-Menge. Sie können also nicht mehr allein durch Autoxidation des Nitroso-4-chlorbenzols entstanden sein.

War Kohlenmonoxid anstelle von Sauerstoff an Ferrohämoglobin gebunden, so fand keine Reaktion mit N-Hydroxy-4-chloracetanilid statt. Reaktiver Sauerstoff für die Oxidation von N-Hydroxy-4-chloracetanilid wurde nicht gebildet, und die Oxidation von Ferrohämoglobin war blockiert. Auch mit der Häm-freien Globin-Komponente des Proteins wurden keine höheren Produktkonzentrationen als bei Kontrollversuchen mit N-Hydroxy-4-chloracetanilid in Puffer gefunden.

Nach Reaktion der Hydroxamsäure mit Ferrihämoglobin wurden niedri-

gere Produktkonzentrationen gefunden als nach Reaktion mit Oxyhämoglobin, aber höhere als im Kontrollversuch. Keilin & Hartree (1943) und Warburg et al. (1931) berichteten über eine Reduktion des Ferrihämoglobins durch Phenylhydroxylamin unter Oxidation zu Nitrosobenzol, gefolgt von der Bindung an Ferrohämoglobin. Der Nitrosobenzol-Ferrohämoglobin-Komplex war aber nicht stabil, sondern wurde langsam unter Verbrauch von Sauerstoff zu Ferrihämoglobin oxidiert. Entsprechend wäre durch eine in geringem Ausmaß stattfindende Oxidation von N-Hydroxy-4-chloracetanilid durch Ferrihämoglobin die Bildung des sekundären Nitroxidradikals und damit der Produkte denkbar. Unter aeroben Bedingungen wird das entstandene Ferrohämoglobin sofort zu Ferrihämoglobin oxidiert und war deshalb nicht nachweisbar.

Nach Blockade der Cystein-SH-Gruppen im Hämoglobin durch p-Chlormercuribenzoat wurde durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid schneller Ferrihämoglobin gebildet, die Konzentration der Reaktionsprodukte war dagegen niedriger. Dieses zunächst widersprüchliche Ergebnis wird damit erklärt, daß durch Blockade der SH-Gruppen mit den voluminösen p-Chlormercuribenzoat-Resten die Tertiärstruktur des Hämoglobins und damit die Häm-Häm-Wechselwirkungen und die Sauerstoff-Affinität verändert worden sind. Auch die Autoxidation von p-Chlormercuribenzoat - behandeltem Hämoglobin durch Luftsauerstoff lief schneller ab als die von nativem Hämoglobin. Taylor et al. (1963) und Riggs & Wolbach (1956) fanden einen kleineren Hill-Koeffizienten, vermutlich durch veränderte Häm-Häm-Wechselwirkungen, für Hämoglobin nach Blockade der freien SH-Gruppen mit p-Chlormercuribenzoat. Rachmilewitz et al. (1971) berichteten über beschleunigte Oxidation der α - und β -Ketten des Hämoglobins durch Kaliumferricyanid, wenn die SH-Gruppen durch p-Chlormercuribenzoat blockiert waren. Dieser sterische Effekt bewirkt offenbar auch, daß die Produktbildung durch die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Oxyhämoglobin gehemmt wird.

Versuche mit $[U-^{14}C]$ -N-Hydroxy-4-chloracetanilid haben gezeigt, daß weder N-Hydroxy-4-chloracetanilid noch eines seiner Produkte in

größerem Umfang an die Hämoglobin-SH-Gruppen gebunden wird. Bestimmung der freien SH-Gruppen des Oxyhämoglobins während der Reaktion mit N-Hydroxy-4-chloracetanilid ergab keine Abnahme in Abhängigkeit von der Ferrihämoglobin-Konzentration.

9. Mechanismus der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Oxyhämoglobin

Die Unterschiede zwischen der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit gereinigtem Human-Hämoglobin beweisen, daß durch die Hydroxamsäure selbst ohne vorherige enzymatische Hydrolyse Hämoglobin oxidiert wird.

Die hohe katalytische Aktivität des Arylhydroxylamins in Erythrozyten-Suspensionen mit 1000 Äquivalenten Ferrihämoglobin pro N-Hydroxy-4-chloranilin ist in Lösungen von isoliertem Hämoglobin verschwunden: nur noch die stöchiometrische Menge Ferrohämoglobin wird pro mol N-Hydroxy-4-chloranilin oxidiert. Bei den Versuchen mit N-Hydroxy-4-chloranilin in vivo wurden 130 mol Ferrihämoglobin pro mol Nitroso-4-chlorbenzol im Blut gefunden, das ist nur ein Zehntel der in den Erythrozyten in vitro beobachteten katalytischen Aktivität. Offenbar wird das Ferrihämoglobin-bildende Redoxpaar N-Hydroxy-4-chloranilin / Nitroso-4-chlorbenzol in vivo rasch inaktiviert.

Die katalytische Aktivität der Hydroxamsäure N-Hydroxy-4-chloracetanilid im Blut der Ratte läßt sich nicht berechnen, weil die in vivo gefundene Nitroso-4-chlorbenzol-Konzentration allein die Menge Ferrihämoglobin im Blut erklären kann. Vermutlich spielt die direkte Hämoglobin-Oxidation durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid in vivo kaum eine Rolle, wenn man berücksichtigt, daß einmal gebildetes N-Hydroxy-4-chloranilin über 2000mal schneller mit Hämoglobin reagiert als die entsprechende Hydroxamsäure selbst. Dagegen ist die katalytische Aktivität der N-Arylaceto-hydroxamsäure in Suspensionen roter Zellen in vitro kaum von der in Lösungen des isolierten Hämoproteins verschieden: 45 Äquivalente Ferrihämoglobin in Hämoglobin-Lösung (versus 54 in Erythrozyten-Suspension) werden pro mol N-Hy-

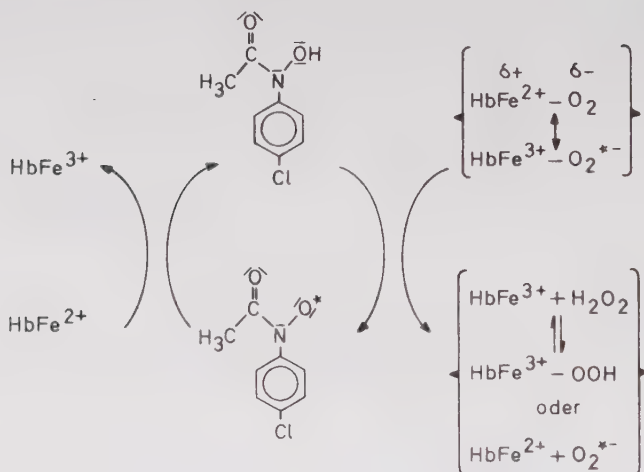
1977 - Hydroxamsäuren. In: *Handbuch der Biochemie*, Band 1, S. 175-176, Verlag Chemie, Weinheim.

Im vorliegenden Fall wird die Hydroxamsäure auch bei der Oxidation von gereinigtem Hämoglobin in Lösung bei geringem Umsatz sprichwörtlich dafür, daß die reaktive Zwischenstufe bei der Reaktion mit Hämoglobin immer wieder zur Hydroxamsäure regeneriert wird, wie das bei einem sekundären aromatischen Nitroxidradikal der Fall wäre (s. Schema 1).

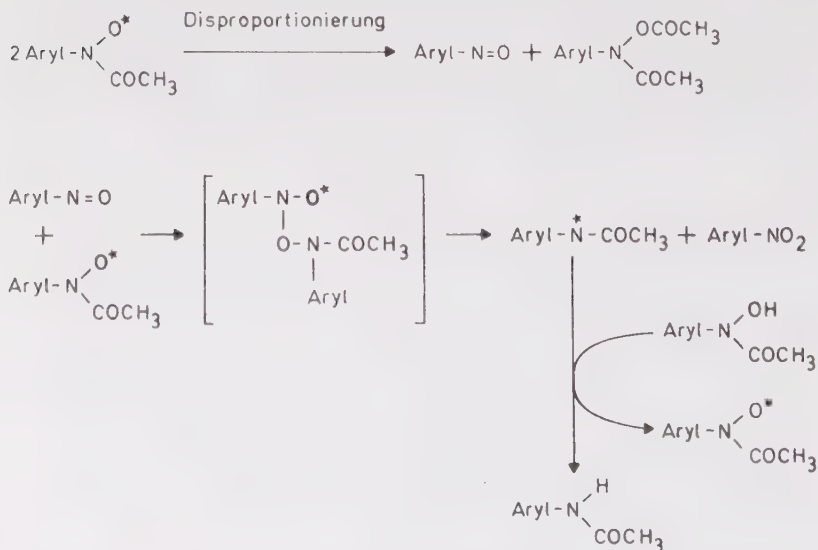
In dieser vorliegenden Form wird die Hydroxamsäure durch den Häm-aktivierten Sauerstoff oder durch eine bei der Autoxidation des Hämoglobins entstehende reaktive Sauerstoffspezies zum sekundären Nitroxidradikal oxidiert. Bei dieser Reaktion kann durch die thermodynamisch begünstigte Übertragung von zwei Elektronen auf den Sauerstoff (Wallace & Caughey, 1975) Ferrihämoglobin und Wasserstoffperoxid (frei oder an Ferrihämoglobin gebunden) entstehen. Ein Elektron stammt vom Hämoglobin-Eisen(II), das zweite vom externen Elektronendonator Hydroxamsäure. Wenn nur ein Elektron der Hydroxamsäure auf den Sauerstoff übertragen wird, bildet sich Ferrohämoglobin und Superoxid. Sowohl aus Wasserstoffperoxid wie aus Superoxid können weitere reaktive Sauerstoffspezies (Hydroxylradikal, Singulett-Sauerstoff, s. Einleitung S. 10) entstehen.

Durch Reaktion des sekundären Nitroxidradikals mit Ferrohämoglobin wird Ferrihämoglobin gebildet unter Rückbildung der Hydroxamsäure, was mit der hohen Hydroxamsäure-Wiedergewinnung zu vereinbaren ist. Da eine Reaktionskinetik zweiter Ordnung für die Reaktion von Oxyrhodoglobin mit N-Arylacetylhydroxamsäuren beobachtet wurde, wird angenommen, daß die Bildung des sekundären aromatischen Nitroxidradikals der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und daß dieses Radikal sehr schnell mit Ferrohämoglobin weiterreagiert. Eine Selbstreaktion des Nitroxidradikals dürfte für die sowohl in Erythrozyten als auch in Hämoglobin-Lösung gefundenen Produkte verantwortlich sein.

Katalyse der Hämoglobin-Oxidation



Inaktivierung des sekundären aromatischen Nitroxid-Radikals (nach Forrester et al., 1970)



Schema 1

Katalyse der Hämoglobin-Oxidation durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid und Bildung der Produkte aus dem sekundären aromatischen Nitroxidradikal

Der im Schema 1 vorgeschlagenen Mechanismus der N-Arylacetoxydrosamsäure-katalysierten Hämoglobin-Oxidation via Nitroxid-Radikal steht in Einklang mit der Hypothese von Michaelis (1947), nach der alle Oxidationen organischer Moleküle in zwei aufeinanderfolgenden univalenten Schritten ablaufen. Dieser Mechanismus führt zur Bildung von radikalischen Zwischenstufen und ist Bedingung für die Reversibilität dieser Reaktionen.

Ein sekundäres aromatisches Nitroxid-Radikal wurde zuerst von Bartsch et al. (1971) durch Oxidation von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren mit Ferricyanid und auch durch Meerrettich-Peroxidase und Wasserstoffperoxid, nicht aber durch mischfunktionelle Oxidasen aus Rattenleber (Bartsch & Hecker, 1971) erzeugt und anhand seiner spektralen Eigenschaften und seines ESR-Signals nachgewiesen. Die Autoren konnten zeigen, daß dieses Radikal in organischen und anorganischen Lösungsmitteln unter Bildung des Nitrosoarens und des N,O-Bisacetats disproportioniert. Forrester et al. (1970) und Versuche von Riedl (1983) haben gezeigt, daß ein ähnliches Produktmuster wie nach Reaktion von Oxyhämoglobin mit N-Arylacetoxydrosamsäuren auch durch Oxidation dieser Verbindungen mit chemischen Oxidationsmitteln erhalten wird.

Durch den von Forrester et al. (1970) vorgeschlagenen oxidativen Mechanismus wird die Bildung von N-Arylacetamid, des formalen Reduktionsprodukts, aus N-Arylacetoxydrosamsäuren verständlich. N-Arylacetoxydrosamsäuren können nur von sehr starken Reduktionsmitteln reduziert werden, die unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht vorhanden waren. Da aber nach diesem Mechanismus gleichzeitig äquimolare Mengen Nitroaren entstehen müßten, jedoch kein 1:1 Verhältnis N-Arylacetamid : Nitroaren gefunden wurde, muß die Gültigkeit dieser Hypothese bezweifelt werden.

10) Die Rolle des Sauerstoffs bei der Reaktion von Hämoglobin mit N-Hydroxy-4-chloracetanilid und N-Hydroxy-4-chloranilin

Sauerstoff ist sowohl für die Reaktion der N-Arylacetoxyhydroxamsäuren wie auch der Arylhydroxylamine mit Hämoglobin essentiell. N-Hydroxy-4-chloracetanilid und N-Hydroxy-4-chloranilin bildeten in Erythrozyten in vitro nur in Gegenwart von Sauerstoff Ferrihämoglobin. Auch mit gereinigtem Desoxy-Hämoglobin unter Stickstoff fand keine Reaktion statt, wie aus dem Fehlen von Adduktspektren und Ferrihämoglobin-Bildung geschlossen wurde.

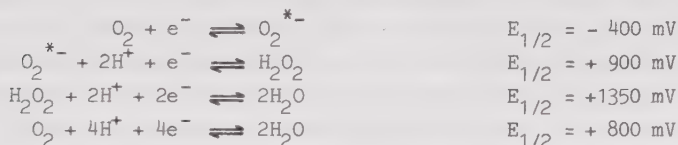
Während die Autoxidation der Arylhydroxylamine in Puffer pH 7.4 langsamer verläuft als in Gegenwart von Hämoglobin, sind N-Arylacetoxyhydroxamsäuren in Abwesenheit von Hämoglobin mehrere Tage in Puffer stabil.

Diese Ergebnisse zeigen, daß a) atmosphärischer Sauerstoff Hydroxamsäuren nicht oxidieren kann und b) der an das Hämoglobin gebundene Sauerstoff oder eine bei der Autoxidation von Oxyhämoglobin entstehende reaktive Sauerstoffspezies an der Reaktion mit N-Arylacetoxyhydroxamsäuren und Arylhydroxylaminen beteiligt ist.

Messungen der Sauerstoff - Konzentration mit Hilfe einer Clark-Elektrode haben gezeigt, daß Sauerstoff bei der Reaktion der Hydroxamsäure mit Oxyhämoglobin freigesetzt und dann langsam verbraucht wird. Bei der Reaktion des Arylhydroxylamins mit Oxyhämoglobin dagegen wird der Sauerstoff aus der Bindung an Hämoglobin sehr schnell freigesetzt und zusätzlich gelöster Sauerstoff verbraucht, obwohl nur 60-70% Ferrihämoglobin bei der Reaktion gebildet werden.

Das Halbstufenpotential für das Redoxpaar N-Hydroxy-4-chloracetanilid / Nitroxid-Radikal ist +610 mV (Riedl, 1983). N-Hydroxy-4-chloracetanilid kann also nur durch starke Oxidationsmittel zu N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid oxidiert werden. Für die Oxidation des Arylhydroxylamins N-Hydroxy-4-chloranilin zu Nitroso-4-chlorbenzol dagegen wurde ein Halbstufenpotential von +80 mV bestimmt

(Riedl, 1983). In Übereinstimmung mit den Gesetzen der Thermodynamik können Elektronen von der Hydroxamsäure, vom Hydroxylamin und von Ferrohämoglobin ($E_{1/2} = +125 \text{ mV}$; Antonini et al., 1964) auf den Sauerstoff übertragen werden, wenn man annimmt, daß nicht atmosphärischer Sauerstoff der Elektronenakzeptor ist, sondern Superoxid, entweder an Hämoglobin gebunden oder bei der Autoxidation freigesetzt.



(James, 1978)

Die Redoxpotentiale der letzten drei Reaktionen liegen über dem ersten Redoxpotential der Hydroxamsäure und des Hydroxylamins. Nur der Wert für die Bildung von Superoxid aus Sauerstoff liegt im negativen Potentialbereich, was einer der Gründe für die Reaktionsträgheit von molekularem Sauerstoff ist. Damit im Einklang steht, daß die Hydroxamsäure N-Hydroxy-4-chloracetanilid von molekularem Sauerstoff nicht oxidiert wird. Das Arylhydroxylamin N-Hydroxy-4-chloranilin wird langsamer als in Gegenwart von Hämoglobin oxidiert, offenbar in einer kinetisch kontrollierten Reaktion.

In der Literatur fanden sich keine Angaben über das Redoxpotential des an Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs. Seine Reaktivität dürfte allerdings größer sein als die von molekularem Sauerstoff (James, 1978).

In verschiedenen Arbeiten (s. Einleitung S. 10) konnte die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies bei der Autoxidation von Oxyhämoglobin nachgewiesen werden. Welche dieser reaktiven Sauerstoffspezies bei der Reaktion der N-Arylacetohydroxamsäuren mit Hämoglobin tatsächlich beteiligt ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Superoxid-Dismutase hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit, was dafür spricht, daß keine hohen stationären Konzentrationen von Superoxid vorliegen.

Auch Katalase hatte keinen Einfluß auf die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Oxyhämoglobin. Es ist allerdings bekannt, daß die Aktivität der Katalase bei niedrigen stationären Konzentrationen von Wasserstoffperoxid gering ist. Cohen & Hochstein (1963) haben gezeigt, daß Katalase die Zelle vor allem bei hohen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen vor dessen toxischer Wirkung schützen kann, während kleine Konzentrationen durch Glutathion-Peroxidase über die Oxidation von Glutathion entgiftet werden. Wie Keilin & Hartree (1935) beschrieben haben, wird Wasserstoffperoxid von Ferrihämoglobin gebunden und kann möglicherweise auch deshalb nicht nachgewiesen werden. Eyer et al. (1975) bestimmten für die Oxidation von Hämoglobin durch Wasserstoffperoxid bei 37°C und pH 7.4 eine Geschwindigkeitskonstante von $250 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$. Für die Geschwindigkeit der Hämoglobin-Oxidation durch N-Hydroxy-4-chloracetanilid wurde unter den gleichen Bedingungen ein Wert von nur $3.4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ bestimmt, ein weiterer Hinweis darauf, daß keine hohen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen auftreten.

Ebenso ist denkbar, daß sich die Reduktion des an Hämoglobin gebundenen Sauerstoff-Moleküls in situ vollzieht, wobei die Hämoglobin-Eisen-Sauerstoff-Bindung erst gelöst wird, wenn vier Elektronen (eines von Hämoglobin-Eisen(II), drei von externen Donatoren) das Sauerstoff-Molekül vollständig zu Wasser reduziert haben.

LITERATURVERZEICHNIS

Aebi, H. (1974)

Katalase.

In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., ed.),
pp. 713 - 724, Verlag Chemie, Weinheim.

Antonini, E. & Brunori, M. (1971)

Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands.

In: Frontiers of Biology (Neuberger, A. & Tatum, E.L., eds.),
vol. 21, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

Antonini, E., Wyman, J., Brunori, M., Taylor, J.F., Rossi-Fanelli,
A. & Caputo, A. (1964)

Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins.
I. Human hemoglobin.

J. Biol. Chem. 239, 907 - 911.

Bamberger, E. (1890)

Über die Reduktion der Nitroverbindungen.

Ber. Dtsch. Chem. Ges. 27, 1347 - 1350.

Bamberger, E. (1900)

Über die Oxydation wässriger Arylhydroxylaminlösungen durch
Luftsauerstoff.

Ber. Dtsch. Chem. Ges. 33, 113 - 122.

Bamberger, E. (1918)

Acetylierung von β -Phenylhydroxylamin.

Ber. Dtsch. Chem. Ges. 51, 636 - 640.

Beilstein, F. & Kurbatow, A. (1879)

Über Chlor- und Chlornitraniline.

Justus Liebigs Ann. Chem. 196, 214 - 238.

Bartsch, H., Traut, M. & Hecker, E. (1971)

On the metabolic activation of N-hydroxy-N-2-acetylaminofluorene
II. Simultaneous formation of 2-nitrosofluorene and N-acetoxy-
N-2-acetylaminofluorene from N-2-acetylaminofluorene via a free
radical intermediate.

Biochim. Biophys. Acta 237, 556 - 566.

Bartsch, H. & Hecker, E. (1971)

On the metabolic activation of the carcinogen N-hydroxy-2-ace-
tyl-aminofluorene. III. Oxidation with horseradish peroxidase.
Biochim. Biophys. Acta 237, 567 - 578.

Bell, F., Kenyon, J. & Robinson, P.H. (1926)

Investigations in the diphenyl series. I. Migration reactions.
J. Chem. Soc. (London), 1239 - 1247.

Bernheim, M.L.C. (1972)

The non-enzymic oxidation of NADH by nitrosobenzene.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1598 - 1602.

Bettendorf, U. (1979)

Peritoneale Resorption über die Lymphbahnen des Zwerchfells.

Dtsch. Med. Wschr. 104, 1143 - 1145.

Beutler, E. (1969)

Drug-induced hemolytic anemia.

Pharmacol. Rev. 21, 73 - 103.

Blisard, K.S. & Mielay, J.J. (1979)

Characterization of the aniline hydroxylase activity of
erythrocytes.

J. Biol. Chem. 254, 5104 - 5110.

Boyer, P.D. (1954)

Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl
groups with organic mercurials.

J. Am. Chem. Soc. 76, 4331 - 4337.

Brodie, B.B. & Axelrod, J. (1948)

The estimation of acetanilide and its metabolic products aniline, N-acetyl-p-aminophenol and p-aminophenol (free and total conjugated) in biological fluids and tissues.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 94, 22 - 28.

Clayson, D.B. (1953)

A working hypothesis for the mode of carcinogenesis of aromatic amines.

Br. J. Cancer 7, 460 - 471.

Cohen, G. & Hochstein, P. (1963)

Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes.

Biochem. Z. 2, 1420 - 1428.

Cramer, J.W., Miller, J.A. & Miller, E.C. (1960)

N-Hydroxylation. A new metabolic reaction observed in the rat with the carcinogen 2-acetylaminofluorene.

J. Biol. Chem. 235, 885 - 888.

Czapski, G. & Bielski, B.H.J. (1963)

The formation and decay of H_2O_3 and HO_2 in electron-irradiated aqueous solutions.

J. Phys. Chem. 67, 2180 - 2184.

Diels, O., Shill, F. & Tolson, S. (1902)

Über die Nitrierung des 2-Aminofluorens.

Ber. Dtsch. Chem. Ges. 355, 3284 - 3290.

Darling, R.C. & Roughton, F.J.W. (1942)

The effect of methemoglobin on the equilibrium between oxygen and hemoglobin.

Amer. J. Physiol. 137, 56 - 68.

Dubach, U.C. & Raaflaub, J. (1969)

Neue Aspekte zur Frage der Nephrotoxizität von Phenacetin.

Experientia 25, 956 - 958.

Eckert, K.-G. & Eyer, P. (1983)

Differences in the reactions of isomeric ortho- and para-amino-phenols with hemoglobin.

Biochem. Pharmacol. 32, 1019 - 1027.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, jr., V. & Featherstone, R.M. (1961)

A new and rapid colorimetric determination of acetylcholin-esterase activity.

Biochem. Pharmacol. 7, 88 - 95.

Elson, L.A., Spinks, A. & Tottey, M.M. (1948)

Some pharmacological properties of p-chloroaniline.

Biochem. J. 42, XLIII.

Estabrook, R.W. & Werringloer, J. (1977)

Cytochrome P-450 - Its role in oxygen activation for drug metabolism.

ACS Symp. Ser. 44 (Drug Metabolism Concepts), 1 - 26.

Eyer, P. (1979a)

Reactions of nitrosobenzene with reduced glutathione.

Chem.-Biol. Interact. 24, 227 - 239.

Eyer, P. (1979b)

Reactions of nitrosobenzene with thiols.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, R 20.

Eyer, P. & Kiese, M. (1976)

Biotransformation of 4-dimethylaminophenol: Reaction with glutathion and some properties of the reaction products.

Chem.-Biol. Interact. 14, 165 - 178.

Eyer, P. & Lengfelder, E. (1984)

Radical formation during autoxidation of 4-dimethylaminophenol and some properties of the reaction products.

Biochem. Pharmacol. 33, 1005 - 1013.

Eyer, P. & Lierheimer, E. (1980)

Biotransformation of nitrosobenzene in the red cell and the role of glutathione.

Xenobiotica 10, 517 - 526.

Eyer, P. & Schneller, M. (1983)

Reactions of the nitroso analogue of chloramphenicol with reduced glutathione.

Biochem. Pharmacol. 32, 1029 - 1036.

Eyer, P., Kiese, M., Lipowsky, G. & Weger, N. (1974)

Reactions of 4-dimethylaminophenol with hemoglobin, and autoxidation of 4-dimethylaminophenol.

Chem.-Biol. Interact. 8, 41 - 59.

Eyer, P., Hertle, H., Kiese, M. & Klein, G. (1975)

Kinetics of ferrihemoglobin formation by some reducing agents, and the role of hydrogen peroxide.

Mol. Pharmacol. 11, 326 - 334.

Ferraiolo, B.L. & Mieyal, J.J. (1982)

Subunit selectivity in the monooxygenase-like activity of tetrameric hemoglobin.

Mol. Pharmacol. 21, 1 - 4.

Fischbach, T. (1975)

N-Hydroxyphenacetin: Darstellung, Biosynthese und Biotransformation

Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Fischbach, T., Hertle, H., Kiese, M. Lenk, W., Sterzl, H. & Meister P. (1982)

Toxicity of certain polycyclic and monocyclic N-arylaceto-hydroxamic acids in rats.

In: Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids (Kehl, H., ed.), pp. 140-148, S. Karger, Basel.

- Forrester, A.R., Ogilvy, M.M. & Thompson, R.H. (1970)
Mode of action of carcinogenic amines. Part I. Oxidation of
N-aryl-hydroxamic acids.
J. Chem. Soc. (C), 1081 - 1083.
- Fries, W., Kiese, M. & Lenk, W. (1973)
Oxidation of polycyclic N-arylacetamides to glycolamides and
hydroxamic acids in rabbits.
Xenobiotica 3, 525 - 540.
- Garrick, L.M., Sharma, V.S., McDonald, M.J. & Ranney, H.M. (1975)
Rat hemoglobin heterogeneity. Two structurally distinct chains
and functional behavior of selected compounds.
Biochem. J. 149, 245 - 258.
- Gattermann, L. & Wieland, T. (1962)
Die Praxis des organischen Chemikers.
Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Goldberg, B. & Stern, A. (1977)
The role of superoxide anion as a toxic species in the
erythrocyte.
Arch. Biochem. Biophys. 178, 218 - 225.
- Golly, I. & Hlavica, P. (1983)
The role of hemoglobin in the N-oxidation of 4-chloroaniline.
Biochim. Biophys. Acta 760, 69 - 76.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. & David, M.M. (1949)
Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.
J. Biol. Chem. 177, 751 - 766.
- Gotoh, T. & Shikama, K. (1976)
Generation of the superoxide radical during autoxidation of
oxymyoglobin.
J. Biochem. 80, 397 - 399.

- Haan, J., Kiese, M. & Werner, A. (1959)
Reduktion von Nitrosobenzol zu Anilin in roten Blutzellen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Pathol.u.Pharmakol. 235, 365 - 372.
- Haber, F. & Weiss, J. (1934)
The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts.
Proc. Royal Soc. Ser. A 147, 332 - 351.
- Haworth, R.D. & Lapworth, A. (1921)
Reduction of emulsified nitro-compounds. Part II. Some
extensions of the method.
J. Chem Soc. (London) 119, 768-777.
- Herr, F. & Kiese, M. (1959)
Bestimmung von Nitrosobenzol im Blute.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.u.Pharmakol. 235, 351 - 353.
- Heubner, W., Wahler, B. & Ziegler, C. (1953)
Über die Bildung von Hämoglobin durch acylierte Phenylhydroxyl-
amine.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 295, 397-403.
- Heumann, K. (1872)
Über chlorierte Azoderivate des Benzols.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 5, 910 - 915.
- Heymann, E. & Krisch, K. (1967)
Phosphorsäure-bis(p-nitro-phenylester), ein neuer Hemmstoff
mikrosomaler Carboxylesterasen.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 609 - 619.
- Heymann, E., Krisch, K., Büch, W. & Buzello, W. (1969)
Inhibition of phenacetin- and acetanilid-induced methemo-
globinemia in the rat by the carboxylesterase inhibitor
bis-(p-nitrophenyl)-phosphat.
Biochem. Pharmacol. 18, 801 - 811.

Hjelm, M., Ragnarsson, B. & Wistrand, P. (1972)

Biochemical effects of aromatic compounds. III. Ferrihemo-globinemia and the presence of p-hydroxy-o-toluidine in human blood after the administration of prilocaine.

Biochem. Pharmacol. 21, 2825 - 2834.

Hlavica, P. (1982)

Biological oxidation of nitrogen in organic compounds and disposition of N-oxidized products.

Crit. Rev. Biochem. 12, 39 - 101.

Hübner, H. & Osten, A. (1881)

Über Diphenyle.

Justus Liebigs Ann. Chem. 209, 339 - 384.

Hustedt, G. & Kiese, M. (1959)

Umsetzungen von Acetanilid und Acetylphenylhydroxylamin im Organismus.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.u.Pharmakol. 236, 435 - 448.

Ingelman-Sundberg, M. & Ekström, G. (1982)

Aniline is hydroxylated by the cytochrome P-450-dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 625 - 631.

Ingold, C.K., Smith, E.W. & Vass, C.C.N. (1927)

Nature of the alternating effect in carbon chains.

XIX. Mechanisms of certain aromatic migrations.

J. Chem. Soc. (London), 1245 - 1250.

James, B.R. (1978)

Interaction of dioxygen with metalloporphyrin.

In: The Porphyrins (Dolphin, D., ed.), vol. 5, pp. 205 - 295, Academic Press, London.

Juchau, M.R. & Symms, K.G. (1972)

Aniline hydroxylation in the human placenta - mechanistic aspects.

Biochem. Pharmacol. 21, 2053 - 2064.

Jung, F. (1940)

Hämoglobin und Oxydationsprodukte des Anilins
(Nitrosobenzolhämoglobin).

Biochem. Z. 305, 248 - 260.

Kawanishi, S. & Caughey, W.S. (1979)

Aquopentacyanoferrate(II): An effective probing electron donor
in the conversion of oxyhemoglobin to methemoglobin and peroxide.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 1203 - 1208.

Keilin, D. & Hartree, E.F. (1943)

Reactions of haemoglobin and its derivatives with phenyl
hydroxylamine and nitrosobenzene.

Nature 151, 390 - 391.

Khan, A.U. (1970)

Singlet molecular oxygen from superoxide anion and sensitized
fluorescence of organic molecules.

Science 168, 476 - 477.

Kiese, M. (1959a)

Oxydation von Anilin zu Nitrosobenzol im Hunde.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.u.Pharmakol. 235, 354 - 359.

Kiese, M. (1959b)

Die Bedeutung der Oxydation von Anilin zu Nitrosobenzol für die
Hämoglobinbildung nach Aufnahme von Anilin in den Organismus.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.u.Pharmakol. 235, 360 - 364.

Kiese, M. (1959c)

Oxydation von Anilin zu Nitrosobenzol in vivo.

Naunyn Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.u.Pharmakol. 236, 19 - 20.

Kiese, M. (1963a)

The effect of certain substituents upon the N-oxidation of aniline in vivo.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.u.Pharmakol. 244, 387 - 404.

Kiese, M. (1963b)

The reduction of p-chloronitrosobenzene in the red cells of dogs.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.u.Pharmakol. 245, 484 - 486.

Kiese, M. (1974)

Methemoglobinemia: A comprehensive treatise.

CRC Press Inc., Cleveland, Ohio.

Kiese, M. & Lenk, W. (1971)

Metabolites of 4-chloroaniline and chloroacetanilides produced by rabbits and pigs.

Biochem. Pharmacol. 20, 379 - 391.

Kiese, M. & Plattig, K.-H. (1959)

Hämoglobinbildung durch Benzoylphenylhydroxylamin.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.u.Pharmakol. 235, 373 - 380.

Kiese, M. & Schneider, C. (1955)

Oxydation von Hämoglobin durch Sauerstoff.

Biochem. Z. 326, 209 - 217.

Kiese, M. & Taeger, K. (1976)

The fate of phenylhydroxylamine in human red cells.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 292, 59 - 66.

Kiese, M. & Wiedemann, I. (1968)

Elimination of N-hydroxy arylamines from the blood of guinea pigs.

Biochem. Pharmacol. 17, 1151 - 1158.

Kiese, M. Reinwein, D. & Waller, H.-D. (1950)

Kinetik der Hämoglobinbildung. IV. Die Hämoglobinbildung durch Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol in roten Zellen in vitro.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. u. Pharmacol. 210, 393 - 398.

Kiese, M., Schneider, C. & Waller, H.-D. (1957a)

Hämoglobinreduktase.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. u. Pharmacol. 231, 158 - 169.

Kiese, M., Resag, K. & Schneider, C. (1957b)

Reduktion von Nitrosobenzol durch Hämoglobinreduktase und durch altes gelbes Ferment.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. u. Pharmacol. 231, 170 - 175.

Kiese, M., Renner, G. & Schlaeger, R. (1971)

Mechanism of the autocatalytic formation of ferrihemoglobin by N,N-dimethylaniline-N-oxide.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 268, 247 - 263.

LaDu, B.N. & Shady, H. (1971)

In: Handbook of Experimental Pharmacology, Concepts of Biochemical Pharmacology (Brodie, B.B. & Gillette, J.R., eds.), vol. 28, part 2, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Lees, W.A. & Burawoy, A. (1965)

The effect of hydrogen bonding on the electronic spectra of organic molecules.

Tetrahedron 19, 419 - 438.

Lenk, W. & Scharmer, U. (1980)

Reaction of microsomal and cytosolic enzymes with N-arylaceto-hydroxamic acids.

Xenobiotica 10, 573 - 590.

Lotlikar, P.D., Miller, E.C., Miller, J.A. & Margreth, A. (1965)
The enzymatic reduction of the N-hydroxy derivatives of 2-acetylaminofluorene and related carcinogens by tissue preparations.
Cancer Res. 25, 1743 - 1752.

Matthies, H. (1956/57)

Untersuchungen über die Methämoglobinrückbildung und über die Aldehyddehydrase in kernlosen Erythrozyten.
Wiss. Zeitschr. Humboldt-Universität Berlin, Jahrg. 6, No. 5,
489 - 520.

McLean, S., Murphy, B.P. Starmer, G.A. & Thomas, J. (1967)

Methaemoglobin formation induced by aromatic amines and amides.
J. Pharm. Pharmac. 19, 146 - 54.

Michaelis, L. (1946)

Fundamentals of oxidation and reduction.
In: Currents in Biochemical Research (Green, D.E., ed.),
pp. 207 - 227, Interscience Publishers Inc., New York.

Mieyal, J.J., Ackerman, R.S., Blumer, J.L. & Freeman, L.S. (1976)

Characterization of enzyme-like activity of human hemoglobin.
J. Biol. Chem. 251, 3436 - 3441.

Mieyal, J.J. & Blumer, J.L. (1976)

Acceleration of the autoxidation of human oxyhemoglobin by aniline and its relation to hemoglobin-catalyzed aniline hydroxylation.
J. Biol. Chem. 251, 3442 - 3446.

Miller, J.A. & Miller, E.C. (1969)

The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides.
Progr. exp. Tumor Res. 11, 273 - 301.

Misra, H.P. & Fridovich, J. (1972)

The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin.

J. Biol. Chem. 247, 6960 - 6962.

Neish, W.J.P. (1959)

Lack of correlation between the methemoglobinogenic activity of azodyes and their carcinogenicity.

Naturwiss. 46, 535.

Neunhoeffer, O. & Ruske, E. (1961)

Gemeinsame Disproportionierung von Nitrosoverbindungen und Aldehyden unter dem Einfluß von Aluminium-Alkoholat. Ein Beitrag zum Mechanismus der Alkohol-Katalyse.

Chem. Ber. 94, 623 - 627.

Omura, T. & Sato, R. (1964)

The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.

I. Evidence for its hemoprotein nature.

J. Biol. Chem. 239, 2370 - 2385.

Peisach, J., Blumenberg, W.E., Wittenberg, B.A. & Wittenberg, J.B. (1968)

The electronic structure of protoheme proteins.

III. Configuration of the heme and its ligands.

J. Biol. Chem. 243, 1871 - 1880.

Poirier, L.A., Miller, J.A. & Miller, E.C. (1963)

The nitrogen- and ring-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene and the failure to detect N-acetylation of 2-aminofluorene in the dog.

Cancer Res. 23, 790 - 800.

Possani, L.D., Banerjee, R., Balny, C. & Douzou, P. (1970)

Oxidation of haemoglobin by oxygen in light: Possible role of singlet oxygen

Nature 226, 861 - 862.

Pranker, T.A.J. (1961)

The Red Cell.

Blackwell, Oxford.

Raaflaub, J. & Dubach, U.C. (1969)

Dose-dependent change in the pattern of phenacetin metabolism in man and its possible significance in analgesic nephropathy.

Klin. Wochenschr. 47, 1286 - 1287.

Rachmilewitz, E.A., Peisach, J. & Blumberg, W.E. (1971)

Studies on the stability of oxyhemoglobin A and its constituent chains and their derivatives.

J. Biol. Chem. 246, 3356 - 3366.

Radomski, J.L. (1979)

The primary aromatic amines: Their biological properties and structure-activity relationships.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 19, 129 - 157.

Radomski, J.L. & Brill, E. (1970)

Bladder cancer induction by aromatic amines: Role of N-hydroxy metabolites.

Science 167, 992 - 993 (1970)

Radomski, J.L. & Brill, E. (1971)

The role of N-oxidation products of aromatic amines in the induction of bladder cancer in the dog.

Arch. Toxikol. 28, 159 - 175.

Riedl, M. (1983)

Das elektrochemische Verhalten von N-Aryl-Acetoxyhydroxamsäuren.
Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Riggs, A.F. & Wolbach, R.A. (1956)

Sulfhydryl groups and the structure of hemoglobin.
J. Gen. Physiol. 39, 585 - 605.

Rising, A. (1904)

Über die Methyl- und Aethyl-Aether des p-Oxyphenylhydroxylamins
und die daraus dargestellten Azoxyverbindungen.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 37, 43 - 47 (1904)

Scheler, W. (1960)

Die Bindung von Nitrosobenzol und Nitrosobenzolderivaten an
Hämoglobin und Hämoglobin-Verbindungen.
Acta Biol. Med. Germ. 5, 382 - 397.

Scott, E.M., Duncan, J.W. & Ekstrand, V. (1965)

The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of human
erythrocytes.
J. Biol. Chem. 240, 481 - 485.

Singleton, S.D. & Murphy, S.D. (1973)

Propanil (3.4-dichlorpropionanilide)-induced methemoglobin
formation in mice in relation to acylamidase activity.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 20 - 29.

Stein, S., Cherian, M.G. & Mazur, A. (1971)

Preparation and properties of six rat hemoglobins. Nonuniform
biosynthesis in marrow erythroid cells.
J. Biol. Chem. 246, 5287 - 5293.

Sterzl, H. (1978)

Darstellung von N-Hydroxy- und kernhydroxylierten Derivaten von 3,4-Dichloranilin und ihre pharmakologische Wirkung.

Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Taylor, J.F., Antonini, E. & Wyman, J. (1963)

The oxygen equilibrium of cysteine-treated human hemoglobin without free sulfhydryl groups.

J. Biol. Chem. 238, 2660 - 2662.

Teale, F.W.J. (1959)

Cleavage of the haem-protein link by acid methylethylketone.

Biochim. Biophys. Acta 35, 543.

Tomoda, A., Yubisui, T., Ida, M., Kawachi, N. & Yoneyama, Y. (1976)

Aniline hydroxylation in human red cells.

Experientia 33, 1276 - 1277.

Uehleke, H. (1962)

Relations between structure, velocity of biological

N-hydroxylation and toxicity of aromatic amines.

In: Proc. Intern. Pharmacol. Meeting, 1st, Stockholm, 1961,

vol. 6, pp. 31 - 37, Pergamon Press, London.

Uehleke, H. (1963)

N-Hydroxylation of carcinogenic amines in vivo and in vitro with liver microsomes.

Biochem. Pharmacol. 12, 219 - 221.

Uehleke, H. (1973)

Mechanisms of methemoglobin formation by therapeutic and environmental agents.

In: Pharmacology and the Future of Man, Proc. 5th Intern. Congr.

Pharmacol., San Francisco, 1972, vol. 2, pp. 124 - 136,

S. Karger, Basel.

Uhlemann, E. (1878)

Ueber Metachlorphenol.

Ber. Dtsch. Chem. Ges. 11, 1161 - 1162.

Wagner, J., Janata, V. & Manova, J. (1968)

Die Wirkung von Phenylhydroxylamin auf die Aktivitäten der SH-Enzyme in Erythrozyten.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. u. Exp. Pathol. 260, 217.

Wallace, W.J. & Caughey, W.S. (1975)

Mechanism for the autoxidation of hemoglobin by phenols, nitrite, and "oxidant" drugs. Peroxide formation by one electron donation to bound dioxygen.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 561 - 567.

Wallace, W.J., Maxwell, J.C. & Caughey, W.S. (1974)

The mechanism of hemoglobin autoxidation. Evidence for proton-assisted nucleophilic displacement of superoxide by anions.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 1104 - 1110.

Walling, C. (1975)

Fenton's reagent revisited.

Acc. Chem. Res. 8, 125 - 131.

Warburg, O., Kubowitz, F. & Christian, W. (1931)

Über die Wirkung von Phenylhydrazin und Phenylhydroxylamin auf den Stoffwechsel der roten Blutzellen.

Biochem. Z. 242, 170 - 205.

Weisburger, E.K. (1978)

Mechanisms of chemical carcinogenesis.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 18, 395 - 415.

Weisburger, J.H., Grantham, P.H. & Weisburger, E.K. (1966)

Transport of carcinogens: Rat blood plasma and red cell binding of isotope after N-hydroxy-2-fluorenylacetamide.

Life Sci. 5, 41 - 45.

Weisburger, J.H., Grantham, P.H. & Weisburger, E.K. (1969)

The transport of chemical carcinogens by blood. Metabolites of N-2-fluorenylacetamide and N-hydroxy-2-fluorenylacetamide as a function of time.

In: Physico-Chemical Mechanisms of Carcinogenesis (Bergmann, E.D. & Pullman, B., eds.), pp. 262 - 283, Proc. Intern. Sympos., Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem.

Weiss, J.J. (1964)

Nature of iron-oxygen-bond in oxyhaemoglobin.

Nature 202, 83 - 84.

Wever, R., Oudega, B. & VanGelder, B.F. (1973)

Generation of superoxide radicals during the autoxidation of mammalian oxyhemoglobin.

Biochim. Biophys. Acta 302, 475 - 478.

White, R.E. & Coon, M.J. (1980)

Oxygen activation by cytochrome P-450.

Ann. Rev. Biochem. 49, 315 - 356.

Wieland, E. & Neumann, H.-G. (1978)

Methemoglobin formation and binding to blood constituents as indicators for formation, availability and reactivity of activated metabolites derived from trans-4-aminostilbene and related aromatic amines.

Arch. Toxikol. 40, 17 - 35.

Wilson, R.H., DeEds, F. & Cox, A.J. (1941)

Toxicity and carcinogenic activity of 2-acetylaminofluorene.

Cancer Res. 1, 595 - 608.

Yamamoto, T., Palmer, G., Gill, D., Salmeen, J.T. & Rimai, L. (1973)

The valence and spin state of iron in oxyhemoglobin as inferred from resonance Raman spectroscopy.

J. Biol. Chem. 248, 5211 - 5213.

Zufall, A. (1981)

Die pK_a -Werte einiger biologisch relevanter Arylamine und Arylhydroxylamine.

Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

ABKÜRZUNGEN

Hb	Hämoglobin
HbFe ²⁺	Ferrohämoglobin
HbFe ³⁺	Ferrihämoglobin, Methämoglobin
HbO ₂	Oxyhämoglobin
DesoxyHb	Desoxyhämoglobin
HbCO	Carbonylhämoglobin
HbpCMB	Hämoglobin, dessen SH-Gruppen mit p-Chlormercuribenzoat blockiert sind
AN	Anilin, C.A. benzenamine
4ClA	4-Chloranilin, C.A. 4-chloro-benzenamine
3.4DClA	3.4-Dichloranilin, C.A. 3.4-dichloro-benzenamine
4EA	4-Ethoxyanilin (4-Phenetidin), C.A. 4-ethoxy-benzenamine
4ABi	4-Aminobiphenyl, C.A. (1,1'-biphenyl)-4-amine
2AF	2-Aminofluoren, C.A. 9H-fluoren-2-amine
NOH-AN	Phenylhydroxylamin, C.A. N-hydroxy-benzenamine
NOH-4ClA	N-Hydroxy-4-chloranilin, C.A. N-hydroxy-4-chloro-benzenamine
NOH-3.4DClA	N-Hydroxy-3.4-dichloranilin, C.A. N-hydroxy-3.4-dichloro-benzenamine
NOH-4EA	N-Hydroxy-4-ethoxyanilin (N-Hydroxy-4-phenetidin), C.A. N-hydroxy-4-ethoxy-benzenamine
NOH-4ABi	N-Hydroxy-4-aminobiphenyl, C.A. N-hydroxy-(1,1'-biphenyl)-4-amine
NOH-2AF	N-Hydroxy-2-aminofluoren, C.A. N-hydroxy-9H-fluoren-2-amine
2-AP	2-Aminophenol
4-AP	4-Aminophenol
2-OH-4ClA	2-Hydroxy-4-chloranilin, C.A. 2-amino-5-chloro-phenol

2-OH-3.4DC1A	2-Hydroxy-3.4-dichloranilin, C.A. 2-amino-5.6-dichlorophenol
6-OH-3.4DC1A	6-Hydroxy-3.4-dichloranilin, C.A. 2-amino-4.5-dichlorophenol
NAPAP	4-Hydroxy-acetanilid (N-Acetyl-p-aminophenol), C.A. N-(4-hydroxyphenyl)-acetamide
AA	Acetanilid, C.A. N-phenyl-acetamide
4ClAA	4-Chloracetanilid, C.A. N-(4-chlorophenyl)-acetamide
4ClPA	4-Chlorpropionanilid, C.A. N-(4-chlorophenyl)-propanamide
3.4DC1AA	3.4-Dichloracetanilid, C.A. N-(3.4-dichlorophenyl)-acetamide
3.4DC1PA	3.4-Dichlorpropionanilid, Propanil, C.A. N-(3.4-dichlorophenyl)-propanamide
4EAA	4-Ethoxyacetanilid (Phenacetin), C.A. N-(4-ethoxyphenyl)-acetamide
4AABi	4-Acetylaminobiphenyl, C.A. N-(1,1'biphenyl)-4yl-acetamide
2AAF	2-Acetylaminofluoren, C.A. N-(9H-fluoren-2yl)-acetamide
NOH-AA	N-Hydroxyacetanilid, C.A. N-phenyl-N-hydroxy-acetamide
NOH-4ClAA	N-Hydroxy-4-chloracetanilid, C.A. N-(4-chlorophenyl)-N-hydroxy-acetamide
NOH-3.4DC1AA	N-Hydroxy-3.4-dichloracetanilid, C.A. N-(3.4-dichlorophenyl)-N-hydroxy-acetamide
NOH-4EAA	N-Hydroxy-4-ethoxyacetanilid (N-Hydroxyphenacetin), C.A. N-(4-ethoxyphenyl)-N-hydroxy-acetamide
NOH-4AABi	N-Hydroxy-4-acetylaminobiphenyl, C.A. N-(1,1'biphenyl)-4yl-N-hydroxy-acetamide
NOH-2AAF	N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren, C.A. N-(9H-fluoren-2yl)-N-hydroxy-acetamide

NOB	Nitrosobenzol, C.A. nitrosobenzene
NO-4ClB	Nitroso-4-chlorbenzol, C.A. 1-chloro-4-nitroso-benzene
NO-3,4DClB	Nitroso-3,4-dichlorbenzol, C.A. 1,2-dichloro-4-nitrosobenzene
NO-4EB	Nitroso-4-ethoxybenzol (Nitrosophenetol), C.A. 1-ethoxy-4-nitrosobenzene
NO-4Bi	4-Nitrosobiphenyl, C.A. 4-nitroso-1,1'-biphenyl
NO-2F	2-Nitrosofluoren, C.A. 2-nitroso-9H-fluoren
NO ₂ B	Nitrobenzol, C.A. nitrobenzene
NO ₂ -4ClB	Nitro-4-chlorbenzol, C.A. 1-chloro-4-nitrobenzene
NO ₂ -3,4DClB	Nitro-3,4-dichlorbenzol, C.A. 1,2-dichloro-4-nitro-benzene
NO ₂ -4EB	Nitro-4-ethoxybenzol, C.A. 1-ethoxy-4-nitrobenzene
NO ₂ -4Bi	4-Nitrobiphenyl, C.A. 4-nitro-1,1'-biphenyl
NO ₂ -2F	2-Nitrofluoren, C.A. 2-nitro-9H-fluoren
BAClB	Bisazoxychlorbenzol, C.A. bis-(4-chlorophenyl)-diazene-1-oxide
BNPP	Phosphorsäure-bis(4-nitrophenylester), C.A. bis-(4-nitrophenylester) phosphoric acid
TOTP	Tri-o-tolylphosphat, C.A. tri-(2-tolylester) phosphoric acid
pCMB	p-Chlormercuribenzoat, C.A. (4-carboxyphenyl) chloro-mercury
PB	Phenobarbital, C.A. sodium 5-ethyl-5-phenyl-2,3,6-(1H,3H,5H)-pyrimidinetrione
3MCh	3-Methylcholanthren, C.A. 1,2-dihydro-3-methyl-benz(j)-aceanthrylene
SOD	Superoxid-Dismutase
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
DC	Dünnschichtchromatographie
i.p.	intraperitoneal
s.c.	subcutan
KG	Körpergewicht

Lebenslauf

- 11.8.1951 geboren in München
Eltern: Hans Sterzl und Gertrud Sterzl, geb Wineck
- 1958-1964 Volksschule in München
- 1964-1971 Pestalozzi-Gymnasium (musisches Gymnasium) München
- 19.6.1971 Reifeprüfung am Pestalozzi-Gymnasium
- 1971-1978 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 25.7.1974 Diplom-Vorprüfung
- 15.2.1977 Mündlicher Teil der Diplom-Hauptprüfung
- 1977-1978 Diplomarbeit mit dem Titel: Darstellung von
N-Hydroxy- und kernhydroxylierten Derivaten von
3.4-Dichloranilin und ihre pharmakologische Wirkung
- 30.3.1978 Diplom in Chemie

Seit Januar 1979 arbeite ich als Assistentin von Prof. Dr. W. Lenk am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München an der vorliegenden Dissertation.

